



Laboratori Campisi

&



PROTEOGEN

VOLUME 1, NUMERO 3

# NEWS

NOVEMBRE 2008

## TERAPIA PER I TUMORI DEL COLON-RETTO: K-RAS GENE GUIDA PER LA PROGNOSI E IL TRATTAMENTO

### SOMMARIO:

TERAPIA PER I TUMORI DEL COLON-RETTO: KRAS, GENE GUIDA PER LA PROGNOSI E IL TRATTAMENTO 1

EPATITE VIRALE DI TIPO C - HCV 2

PCR- REAL TIME 3

SERVIZI 4

### NOTIZIE DI RILIEVO:

- Il prossimo Convegno in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Catania, diretto dalla prof.ssa Marcella Renis, tratterà l'argomento :

“ Stress ossidativo, radicali liberi e antiossidanti. Dalla ricerca di base alla pratica clinica. Aspetti fisiopatologici e diagnostico-terapeutico”

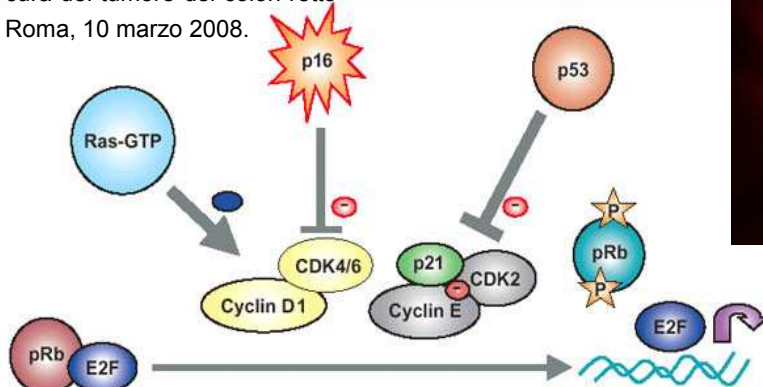
Con oltre 20000 nuovi casi anno nei maschi e più di 17.000 nelle donne, il cancro colon rettale rappresenta una delle più diffuse forme di tumore in Italia. Nei Paesi occidentali il cancro del colon-retto rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità, dopo quello della mammella nella donna e quello del polmone nell'uomo.

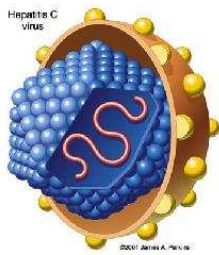
Le future strategie di trattamento, basate sulla presenza del gene K-ras mutato e sulla possibilità di una target therapy, con farmaci attivi nei confronti delle cellule che mostrano questa caratteristica oltre che sulle speranze offerte dalla caratterizzazione delle cellule staminali tumorali, sono state sotto la lente di ingrandimento dagli esperti presenti alla Tavola Rotonda “Nuove frontiere nella cura del tumore del colon-retto” Roma, 10 marzo 2008.

La target therapy, ovvero il trattamento su misura disegnato in base alle caratteristiche delle cellule tumorali con conseguente incremento dell'efficacia e diminuzione della tossicità per le cellule sane, è destinata a diventare l'approccio farmacologico ideale per il futuro nella cura dei tumori del colon-retto. Particolare attenzione va prestata in questo senso al gene K-ras, che quando mutato favorisce la replicazione incontrollata delle cellule tumorali, ed è legato ad una prognosi peggiore della malattia. La ricerca studiando come la presenza del gene K-ras mutato possa influire sull'efficacia di specifiche terapie biologiche, come quella a base di panitumumab e, di conseguenza, permetta di selezionare i pazienti nei quali la terapia è davvero vantaggiosa.

Da questo punto di vista il test genetico per le mutazioni del gene K-ras appare di estrema importanza pratica.

Le caratteristiche genetiche delle cellule tumorali, nel prossimo futuro, sono destinate quindi a diventare non solo un fattore prognostico, capace di far prevedere evoluzione più o meno favorevole di un tumore, ma anche un fattore chiave per scegliere le terapie più adatte ad ogni singolo paziente, che ne potrà trarre maggiore beneficio, riducendo possibili sprechi e quindi consentendo di mantenere sostenibile per il Sistema Sanitario Nazionale l'impiego delle terapie





## EPATITE VIRALE DI TIPO C - HCV

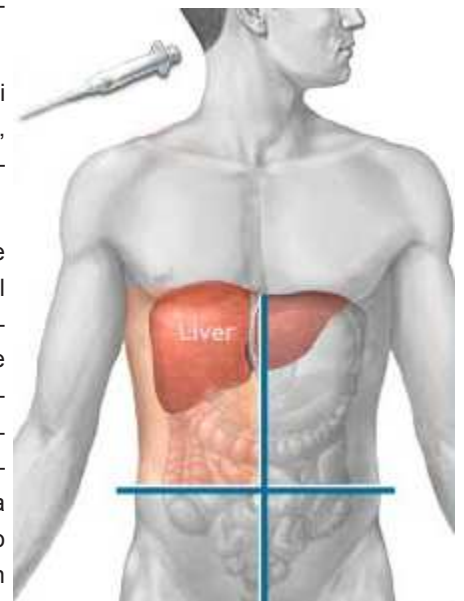
Il 52% ed il 25% dei carcinomi epatocellulari presenti nel mondo sono attribuiti rispettivamente al virus dell'epatite B (HBV) ed al virus dell'epatite C (HCV). Esiste infatti un'elevata diffusione mondiale di entrambi i virus: 300.000.000 portatori di HBV e 150.000.000 portatori di HCV.

Il virus dell'epatite C è considerato il principale agente eziologico nel 90-95% dei casi di epatite post trasfusionale di tipo non A e non B, è un virus a filamento singolo di RNA a senso positivo, con un genoma di circa 10.000 nucleotidi codificante 3.000 amminoacidi ed appartiene alla famiglia delle Flaviviridae. Essendo un virus ematogeno, l'HCV può essere trasmesso dal sangue e dagli emoderivati.

L'adozione diffusa di misure di screening anti-HCV del sangue ha considerevolmente abbassato il rischio di epatite associata a trasfusioni. L'incidenza dell'infezione da HCV è maggiore nei casi di abuso di stupefacenti per via endovenosa e, in misura minore, con altre esposizioni sottocutanee.

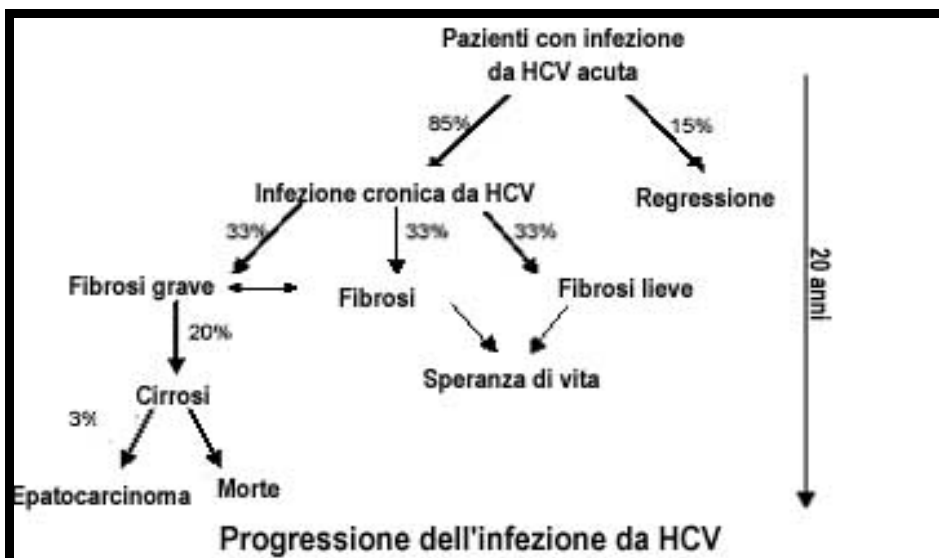
La presenza di anticorpi anti-HCV nei pazienti infetti da HCV ha indotto lo sviluppo di esami immunosierologici specifici a tali anticorpi. La presenza di anticorpi anti-HCV, tuttavia, è indice di una precedente esposizione all'infezione da HCV, ma non può essere considerata il segnale di un'infezione in corso.

La misurazione dei livelli di alanina aminotransferasi (ALT) è considerata un indicatore sostitutivo dell'infezione da HCV, ma non rappresenta una misura diretta di viremia. Il livello di elevazione dell'ALT non può essere messo in relazione diretta con il livello dell'infezione da HCV. Infatti, i livelli di ALT possono essere elevati in seguito a varie cause di infiammazione epatica che includono, senza limitarsi ad essa, l'epatite virale. Al contrario, la rilevazione e la quantificazione dell'RNA dell'HCV mediante amplificazione dell'acido nucleico della reazione polimerasica a catena (PCR) offre una misura della viremia attiva. Tramite la tecnica della PCR REAL-TIME, è possibile rilevare la viremia da HCV prima della sierconversione immunologica e rilevare i cambiamenti nel carico virale nei pazienti con infezione cronica da HCV, con risposta anticorpale positiva e in terapia con interferone.



La P.C.R. REAL\_TIME consente di ricercare in modo diretto l'RNA virale in campioni biologici quali il siero, plasma e biopsie.

Le metodiche di biologia molecolare rappresentano uno strumento efficace per analizzare la cinetica di replicazione virale in tutte quelle situazioni cliniche dove il valore prognostico e diagnostico della carica virale può contribuire a migliorare la gestione del paziente.



La **ricerca qualitativa** dell'HCV-RNA rappresenta una conferma indispensabile della presenza effettiva dell'infezione e resta l'unico sistema in grado di valutare la guarigione associata alla completa scomparsa del virus.

La **ricerca quantitativa** dell'HCV-RNA è un'informazione indispensabile perché può predire la risposta al trattamento della terapia antivirale, quindi la possibilità di monitorare l'effetto Dose-Risposta.

# PCR– REAL TIME

## Il principio della tecnica

La PCR si basa sull'impiego di un enzima, la Taq Polimerasi, che catalizza la reazione di amplificazione in vitro di una particolare sequenza di DNA a partire da una frazione di acido nucleico che viene utilizzato come stampo.

Nel caso della Real Time PCR è anche possibile monitorare l'andamento della reazione mentre è ancora in svolgimento ed i dati che si ottengono a fine ciclo si possono utilizzare per effettuare una quantificazione relativa del frammento amplificato. Questo è possibile tramite l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione PCR. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore viene quindi misurata in tempo reale da una telecamera CCD. Tutti le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da personal computer.

Uno dei saggi più diffusi per PCR real-time è il sistema "TaqMan", il quale utilizza una sonda contenente due fluorocromi: FAM (6-carboxy-fluorescein) come reporter fluorescente legato covalentemente all'estremità in 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) come quencher fluorescente legato covalentemente all'estremità in 3'. La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del transgene da amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher". In una configurazione di questo tipo la molecola "Quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter": nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi

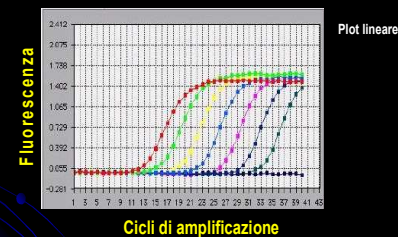
In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione.

La possibilità di utilizzare vari tipi di fluorocromi per marcare sonde diverse consente inoltre di rilevare contemporaneamente più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex.

Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente.

Una curva di referenza costruita con i Ct di campioni standard a contenuto di DNA noto in funzione del logaritmo della relativa quantità di DNA consente poi l'estrapolazione del contenuto di DNA nei campioni incogniti. Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alle PCR tradizionali, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

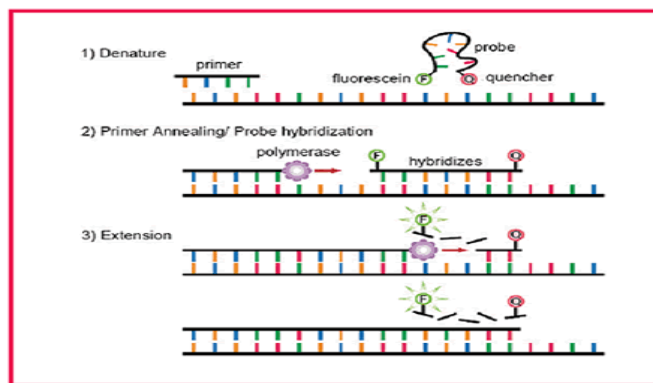
## Curve di amplificazione



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui  $C_T$  (=Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale

## Applicazioni della PCR Real-Time :

- Quantificazione virale
- Quantificazione dell'espressione genica
- Efficacia della terapia farmacologica
- Misura dei danni al DNA
- Controllo di qualità e validazione dei saggi
- Detenzione dei patogeni
- Controllo degli OGM
- Genotyping
- MRD (Minimal Residual Disease) è la quota residua di cellule neoplasiche non eradicata dalla terapia di induzione della remissione o dalle successive misure terapeutiche.



TaqMan® Probe Method

- **LABORATORIO GENERALE DI BASE**

- **CITOGENETICA**

- **BIOLOGIA MOLECOLARE**

- ◆ TIPIZZAZIONE HPV ( 31 GENOTIPI VIRALE)
- ◆ HCV QUALITATIVA + QUANTITATIVA
- ◆ HBV QUALITATIVA + QUANTITATIVA
- ◆ AZF ( MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y)
- ◆ HFE
- ◆ FATTORI DI COAGULAZIONE ( 12 MUTAZIONI)
- ◆ TIPIZZAZIONE HLA I E II CLASSE
- ◆ CELIACHIA (DQ2-DR4)
- ◆ CFTR (36 MUTAZIONI)
- ◆ BETA TALASSEMIA
- ◆ B27
- ◆ K-RAS

- **TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA**

- **TEST DI PATERNITA**

- **RILEVAZIONE DI OGM**

- **FISH**

**I CAMPIONI POSSONO ESSERE INVIATI:**

- MEDIANTE UN PROTOCOLLO CHE VERRA FORNITO AL MOMENTO DELLA RICHIESTA DEL SERVIZIO
- ATTRAVERSO IL NOSTRO SERVICE CHE PRELEVA I CAMPIONI BIOLOGICI DA STRUTTURE PUBBLICHE E PRIVATE O CORRIERE CONVENZIONATO.

**CONSEGNA REFFERTI :**

- ONLINE (ATTRAVERSO L'AREA RISERVATA DEL NOSTRO SITO INTERNET)

- **SERVIZIO DI SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO DI DNA** (DIAGNOSI E RICERCA)

- **ALLERGIE** :DOSAGGIO DELLE Ig E TOTALI

DOSSAGIO DELLE Ig E SPECIFICHE PER CIRCA 200 ALLERGENI

- **INTOLLERANZE ALIMENTARI**: DOSAGGIO DELLE Ig G-4 PER CIRCA 100 ALIMENTI

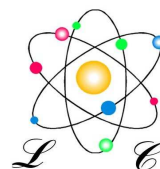
- **GASTROPANEL** : DOSSAGGIO DI PEPSINOGENO 1/2, GASTRINA 17 E ANTIGENI ANTI HP, INTERPRETATO DA UN SOFISTICATO PROGRAMMA ANALOGICO CHE FORNISCE INFORMAZIONI SULLA PATOLOGIA GASTRI.

**L.C. LABORATORI CAMPISI &  
PROTEOGEN**

Corso Vittorio Emanuele, 231/243  
96012 Avola (SR)

Tel.: 0931/832499 Fax: 0931/814068

www.lccampisi.it - info@katamail.com  
www.proteogen.it - info@katamail.com



**Laboratori Campisi**



**PROTEOGEN**

Centro Ricerche Biologie Avanzate