

## **Diagnosi esaustiva dell'X-Fragile (Sindrome di Martin Bell o Sindrome da ritardo mentale).**

La **Sindrome dell'X Fragile** è una condizione genetica ereditaria, cioè si trasmette dai genitori ai figli, ed è causa di disabilità cognitiva, problemi di apprendimento e relazionali.

Si presenta sia **nei maschi che nelle femmine** e i sintomi si presentano in maniera più evidente nei maschi. L'incidenza è stimata in 1 caso su 4000 maschi e 1 su 7000 femmine.

La sindrome è stata descritta **per la prima volta nel 1943** da Martin e Bell, ma solo negli anni settanta divenne chiaro che la presenza di queste caratteristiche poteva essere ereditaria. Le basi molecolari della sindrome vennero **scoperte solo nel 1991** quando un ricercatore di nome Verkerk e i suoi collaboratori riuscirono a isolare il gene che viene colpito dalla mutazione, **il gene FMR1** (Fragile X Mental Retardation 1) posizionato sul braccio lungo del cromosoma X che presenta una rottura, da cui la definizione di "X Fragile".

La Sindrome è causata dall'**espansione di una ripetizione trinucleotidica CGG** (tripletta) all'interno del **gene FMR1** (Fragile X Mental Retardation 1) posizionato sul cromosoma X. Quando il numero delle ripetizioni CGG **supera 200** (mutazione completa) siamo in presenza della Sindrome (FXS).

Il **gene FMR1** ha una funzione che potrebbe essere definita "regolativa", aiuta cioè altri geni a organizzare la propria attività e questo avviene attraverso la produzione di una **proteina FMRP** (FragileX Mental Retardation Protein). Attraverso le molteplici interazioni che FMRP contrae con proteine e RNA messaggeri, essa prende parte a **importanti processi neuronali**, quali il trasporto dei messaggeri e la regolazione della traduzione nelle sinapsi. Nel caso di mutazione completa **il gene FMR1 non è più in grado di produrre la proteina FMRP** e la sua mancanza influenza negativamente il funzionamento di altri geni. Si verifica in questo modo l'insorgenza della Sindrome.

Nella popolazione generale la ripetizione della tripletta è molto variabile in termini di composizione ed estensione. In base al numero di triplette osservato è possibile **distinguere il numero delle ripetizioni in quattro casistiche**:

- normale (5-45 ripetizioni)
- intermedio (45-55 ripetizioni)
- premutazione (55-200 ripetizioni)
- mutazione piena (oltre 200 ripetizioni)

Per ragioni non ancora chiare, le ripetizioni di tipo intermedio e premutato tendono e **espandersi durante la trasmissione alla generazione successiva** e nella trasmissione per via materna possono espandersi fino alla condizione di mutazione piena.

In letteratura è ampiamente riconosciuto che la metodica di PCR classica consente di amplificare efficacemente fino a 100 ripetizioni CGG e che oltre tale espansione la sola metodica di ibridazione mediante southern blot, metodica piuttosto laboriosa, che consente di visualizzare espansioni superiori alle 100 triplette a condizione che si disponga di una elevata quantità di DNA da analizzare. **Presso il ns. laboratorio è disponibile il test eseguito con il kit "Amplidex FMR1 PCR" marcato IVD-CE dell'Asuragen Genetics, in grado di evidenziare anche la presenza di ripetizioni superiori alle 200 triplette e di coprire quindi l'intero intervallo dalle espansioni normali alle espansioni mutate complete (Full-Mutation).** Inoltre le reazioni di PCR sono costantemente monitorate mediante l'impiego del **1° WHO International Genetic Reference Panel per X-Fragile Syndrome, Human gDNA NIBSC code 08/158 ver. 5 date 13/12/2012.**

## Diagnosi di FRAXE.

**Gene FMR2 (FRAX-E):** La sindrome dell'XE fragile (FRAXE) è una rara condizione genetica associata a lieve disabilità intellettiva in assenza di anomalie fisiche. La sindrome è una forma di ritardo mentale non sindromico legato al cromosoma 'X (NS-XLMR Non Specific-X linked Mental Retardation), caratterizzata da lieve ritardo mentale. La FRAXE è la forma più comune di NS-XLMR con una prevalenza nella popolazione generale di circa 1/100.000-150.000. L'incidenza è stimata in circa 1 su 25.000 a 1 su 50.000 maschi. Ritardi nello sviluppo (cioè ritardi nella parola, nella lingua, nelle abilità motorie, sociali o di pensiero) sono spesso visti in individui con questa condizione. Gli individui affetti possono anche avere comportamenti comunemente osservati nei bambini con autismo (ad esempio, scarso contatto visivo, uso ripetitivo del linguaggio, battito delle mani), problemi di attenzione e iperattività. Questo **sito fragile FRAXE** (gene **FMR2**) situato poco distante da FRAXA, è anch'esso caratterizzato dalla possibile espansione della tripletta "GCC (o CGG)". I soggetti **normali**, in questo gene, presentano da 6 a 25 ripetizioni della tripletta GCC, mentre i soggetti con più di 200 ripetizioni, come per il gene FMR-1, manifestano il ritardo mentale. Lo stato di **premutazione** è caratterizzato dalla presenza di un numero di triplette compreso tra 50 e 200 triplette ripetute. La FRAXE si manifesta nei soggetti con più di 200 ripetizioni CGG nella 5' UTR del gene AFF2 (FMR2 posizione Xq27.3-q28). Questo gene produce una proteina (FMR2P Fragile Mental Retardation protein 2) che svolge un ruolo importante nel normale sviluppo cerebrale. L'approccio analitico è lo stesso di quello utilizzato per lo studio di FMR1, ed è in grado di evidenziare anche la "Full Mutation" e permette un'identificazione accurata dei soggetti a rischio e dei portatori.

Altri polimorfismi genetici introdotti di recente presso i ns. laboratori sono:

## Nuovi Polimorfismi

- Polimorfismo HPA GP IA/IIA (C807T)
- Polimorfismo MTRR A66G
- Polimorfismo MTR A2756G
- Polimorfismi VEGFR (-634 G/C e -2058 A/C)
- Polimorfismo Alfa-TNF (-308 G/A -238 G/A)
- Polimorfismo Fattore XII C46T -238 G/A)
- Polimorfismi del gene AOC1 (DAO – Diamminossidasi) sensibilità ad istamina e FANS (c.-691G>T, c.-16-78A>T, c.47C>T, c.995C>T)
- Polimorfismi dei geni GST (Glutazione S-Transferasi) per la difesa verso le sostanze tossiche (GST-T1, GST-M1, GST-P1 c.313A>G, GST-P1 c.341C>T)

## Età Biologica

- Studio Lunghezza media dei Telomeri (età biologica)

## Nutrigenomica

- Recettore Vitamina D FokI (F/f)
- Polimorfismo Superossido Dismutasi (SOD3 C760G)
- Polimorfismo PPAR-G esone 6 (P12A C/G)
- Polimorfismo IL-10 (-1082G/A)
- Polimorfismo Lattasi (LCT -13910C/T intolleranza al lattosio)
- Polimorfismi CCR3 / IL-18RAP (fattori di rischio celiachia)

## Studio di geni completi

- Analisi Molecolare del Gene della Emocromatosi Tipo 1 (HFE, 6 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene della Emocromatosi Tipo 4 (FPN1 o SLC40A1, 8 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene della Emocromatosi Tipo 3 (TFR2, 19 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene recettore dell'Eritropoietina (EPOR, 8 esoni)
- Analisi molecolare del gene del Fattore VIII (Emofilia A, 26 esoni)
- Analisi molecolare del gene del Fattore IX (Emofilia B, 8 esoni)
- Analisi molecolare del gene del Fattore X (Fattore di Stuart-Power 8 esoni)
- Pannello Aritmie e Cardiomiopatie (92 geni)
- Analisi Molecolare del Gene del Favismo (G6PDH, 13 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene della Fenilalaninidrossilasi (PAH 13 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene CYP21A2 (SAG 10 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene ACVR1 Fibrodisplasia Ossificante (Activin A receptor type, 11 esoni)
- Analisi Molecolare del Gene FGFR3 Acondroplasia (Sequenza esone 9 e ARMS)
- Analisi molecolare del promotore del gene UGT1A1 Sindrome di

Gilbert (UGTA1 studio del TATABox)

## GCH Array

- CGH Array oligo 8x60K
- CGH Array oligo 4x180K
- CGH Array oligo 4x180K SNP
- CGH Array oligo 8x60K SNP

Accanto agli ormai consolidati Oligo Array, applicati in diagnosi pre e post natale, nel campo della citogenetica molecolare è stata recentemente introdotta una **nuova tecnologia array**, nota come array CGH+SNP. Tale tecnologia ha il vantaggio di essere in grado di evidenziare non solo le variazioni del numero di copie del DNA ma anche le **disomie uniparentali** (UPD), ovvero la presenza di due cromosomi omologhi provenienti da un solo genitore, e le **perdite di eterozigotità** (LOH, *loss of heterozigosity*) di determinate regioni cromosomiche. Le disomie uniparentali sono causate principalmente da eventi di non-disgiunzione, seguiti da meccanismi di correzione di trisomie o monosomie e, nella maggioranza dei casi, sono associate ad età materna avanzata. Le disomie uniparentali o la perdita di eterozigotità sono causa di diversi tipi di patologie genetiche sia costituzionali che acquisite.

## Diagnostica Virale e Batteriologica

- **Test Qualitativo o quantitativo con metodica Real Time PCR per la ricerca diretta del Virus dell'Epatite A (HAV-RNA):** Il virus dell'epatite A (HAV) è un virus a RNA appartenente agli Hepatovirus, un genere della famiglia dei Picornaviridae. L'HAV è privo di pericapside ed è costituito da un capsidico icosaedrico dal diametro di 27 nm costituito da quattro polipeptidi (VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5). HAV possiede un solo sierotipo. Il capsidico contiene un singolo filamento di RNA a polarità positiva lungo 7.478 nucleotidi. HAV si lega mediante il "canyon" formato dalle proteine del capsidico al recettore espresso sugli epatociti cui consegue una modificazione conformazionale del capsidico con rilascio di VP4. Il genoma viene quindi introdotto nella cellula bersaglio attraverso il canale venutosi a creare dopo lo spostamento di VP1 e il rilascio di VP4. L'RNA virale si associa ai **ribosomi** tramite un'ansa simile a quella che si trova sugli **mRNA** e viene tradotto in 10-15 minuti, dopodiché il polipeptide che si è venuto a creare viene tagliato da una **proteasi** codificata dal virus. La replicazione dell'RNA del virus coinvolge una RNA-polimerasi RNA-dipendente virale che a partire dall'RNA a polarità positiva trascrive un mRNA a polarità negativa dal quale viene sintetizzato l'RNA a polarità

positiva del virus. HAV si trasmette quasi esclusivamente per via oro-fecale, generalmente mediante l'ingestione di acqua o cibo contaminato, spesso molluschi bivalvi come ostriche, vongole o cozze che filtrano acqua con residui fecali contenenti il virus, mentre è insolita la trasmissione parenterale così come quella sessuale. Il capsido di HAV è particolarmente resistente per un picornavirus, sopravvive infatti in acqua dolce o salata, resiste ai detergenti, sopporta temperature fino a 60 °C e ambienti a pH 1.

- **Test Qualitativo o quantitativo con metodica Real Time PCR per la ricerca diretta Virus dell'Epatite E (HEV-RNA):** L'epatite E' è un'inflammatione del fegato causata dall'infezione dal virus dell'epatite E.[1] È una delle cinque epatiti virali che colpiscono l'uomo note: A, B, C, D ed E. Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus icosaedrico dell'RNA a senso unico, a filamento singolo. L'infezione di questo virus è stata documentata per la prima volta nel 1955 durante un'epidemia avvenuta a Nuova Delhi, in India. Sebbene l'epatite E spesso causi un'infezione acuta e autolimitante (l'infezione virale è temporanea e l'individuo guarisce) con bassi tassi di mortalità nel mondo occidentale, presenta un alto rischio di sviluppare un'epatite cronica nelle persone con un sistema immunitario indebolito con più alti tassi di mortalità. Coloro che si sono sottoposti ad un trapianto d'organo e che quindi hanno assunto farmaci per indebolire il sistema immunitario e quindi prevenire il rigetto sono ritenuti gli individui principalmente a rischio di incorrere nell'epatite cronica E.[6]. Clinicamente la condizione è paragonabile all'epatite A, ma nelle donne in gravidanza assume una forma spesso più grave ed è talvolta associata ad una sindrome clinica chiamata insufficienza epatica fulminante. Le donne incinte, in particolare quelle al terzo trimestre, hanno un tasso di mortalità più elevato di circa il 20%.[7] Nel 2013 l'infezione da epatite E ha interessato circa 28 milioni di persone.[8]. Anticorpi anti-HEV sono stati riscontrati in topi, ratti, conigli e manguste. Principalmente maiali e cinghiali sono il serbatoio del virus. Fra le fonti di infezioni, la più comune è l'assunzione di acqua contaminata da feci, la trasmissione avviene per via oro-fecale. [14] Le possibilità di diagnosi e quindi lo studio dell'epatite E sono ancora oggi strettamente limitate a pochissimi centri di ricerca. La recente caratterizzazione del genoma virale ha reso possibile, l'allestimento di un test biomolecolare di Retrotrascrizione e RealTime PCR.
- **Test Qualitativo con metodica Real Time PCR per la ricerca diretta del Virus del Morbillo (Measles virus):** Il morbillo è una malattia infettiva esantematica altamente contagiosa causata da un virus, il *Paramyxovirus* del genere *Morbillivirus*. Il morbillo provoca principalmente un'eruzione cutanea simile a quelle della rosolia o della scarlattina, che il più delle volte si risolve spontaneamente ma che può, in casi relativamente rari, portare alla morte, perdita della vista, perdita dell'udito, danni cerebrali permanenti. I sintomi si sviluppano solitamente in 10-12 giorni dopo l'esposizione ad una persona infetta e si protraggono per 7-10 giorni. Le complicanze si verificano in circa

il 30% dei casi, nei bambini inferiori a 5 anni di vita, e possono includere, tra le altre, diarrea (8%), otite (7%), polmonite (6%), encefalite (0,1%). La malattia è responsabile di un numero di morti che va dalle 30 alle 100 ogni 100.000 persone infette e, solitamente, per superinfezioni batteriche.

- **Studio del Microbiota Intestinale Test quantitativo con metodica Real Time PCR per la caratterizzazione e quantificazione delle popolazioni batteriche costituenti la flora intestinale:** La flora

batterica intestinale detta “Microbiota Intestinale” è costituita da miliardi di microrganismi che risiedono stabilmente nella mucosa intestinale favorendo i processi di transito, di assorbimento e di trasporto. Il numero di batteri che solitamente colonizza l’intestino è di circa 10mila miliardi ( $10^{12}$  -  $10^{14}$ ) suddivisi in circa 500 specie differenti e può essere suddivisa in due tipologie:

**Saccarolitica:** (soprattutto lattobacilli e streptococchi) che svolgono un’azione fermentativa e producono acido lattico.

**Proteolitica:** (E. Coli, Enterobacteriacee, Bacteroides e clostridium) che digeriscono le proteine, alcalinizzando l’ambiente intestinale.

L’equilibrio tra le diverse specie presenti è detto **“eubiosi”** ed è fondamentale per un buon funzionamento di tutto l’organismo. Se viene alterato tale equilibrio si ha un aumento della fermentazione o della putrefazione generando una disbiosi. Quando la flora intestinale buona viene danneggiata i batteri patogeni prendono il sopravvento causando un’alterazione dell’equilibrio intestinale detto “Disbiosi”. La disbiosi può essere causata da farmaci, alcool, stress, vita sregolata, alimentazione non corretta. Una **disbiosi fermentativa** in genere è la conseguenza di una dieta ricca di carboidrati, una cattiva masticazione e digestione di essi. Questa può abbassare il pH intestinale causando una maggiore acidità delle feci sfavorendo la crescita dei gruppi batterici proteolitici e favorendo la proliferazione ad esempio di candida (candidosi intestinale) che di conseguenza possono causare frequentemente infezioni alle vie genito-urinarie (ad es. cistiti) o alterazioni dell’alvo. Una **disbiosi putrefattiva** è invece favorita da un’alimentazione scarsa in fibre, ricca di proteine, una cattiva masticazione e digestione di queste. Causa alterazioni soprattutto a carico del colon (coliti, coliti ulcerose, morbo di Chron) con stipsi, alitosi e stanchezza; aumento del pH intestinale con conseguente alcalinizzazione delle feci associata ad una marcata riduzione dei lattobacilli e dei bifidobatteri (probiotici). L’alterazione di tale equilibrio viene strettamente correlato a patologie epatiche, patologie dismetaboliche (diabete mellito) patologie immunitarie, patologie circolatorie e psicosomatiche, inoltre si traduce anche in aumento o diminuzione della massa corporea grassa (tendenza ad ingrassare). La Presenza di clostridium perfringens nelle anse anaerobiche intestinali entro il limite indicato nella tabella dei valori di riferimento non è indice di disbiosi, dal momento che fa parte della normale comunità microbiota intestinale.

**Tutti i ns. metodi sono validati e monitorati mediante l'utilizzo costante di Pannelli di Standard Internazionali di riferimento riconosciuti e certificati dal WHO e preparati dal NIBSC (UK) o dal Paul-Ehrlich-Institut.**

**Il Laboratorio MeriGen C. Pandolfi & C. oltre a partecipare alle VEQ classiche di patologia clinica partecipa ai programmi di internazionali di VEQ Quality Control per la valutazione delle metodiche bio-molecolari di rilevazione (test genetici, diagnostica virale e batteriologica) dell'ente QCMD (QCMD EQA programme Quality control for Molecular Diagnostics UK).**

**Per ogni altra richiesta siamo a disposizione per discuterne l'eventuale fattibilità.**

*Il Direttore Tecnico  
Di Biase Dr. Sebastiano*



MeriGen

**Diagnostica Clinica e Biologia Molecolare**

MeriGen Research srl – Ricerca e Sviluppo Diagnostico

Laboratorio “Cesare Pandolfi & C.” sas – Centro Diagnostico  
Accreditato SSN Settori Specialistici A1, A2, A3, A4, A6, R

Traversa Michele Pietravalle, 11 – 80131 – Napoli

Tel. 0815465026

email: [info@merigen.it](mailto:info@merigen.it)

sito web: [www.merigen.it](http://www.merigen.it)