

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia



Fondazione IRCCS
Policlinico San Matteo

ATS Pavia

GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

con il Policlinico San Matteo

Aula Magna "C. Golgi" & WEBINAR

8 maggio 2024

Valentina Franco

*Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università di Pavia
Fondazione Mondino, Pavia*

BIO-HIT: UNA PIATTAFORMA HIGH- THROUGHPUT PER BIOMARKER E DRUG DISCOVERY





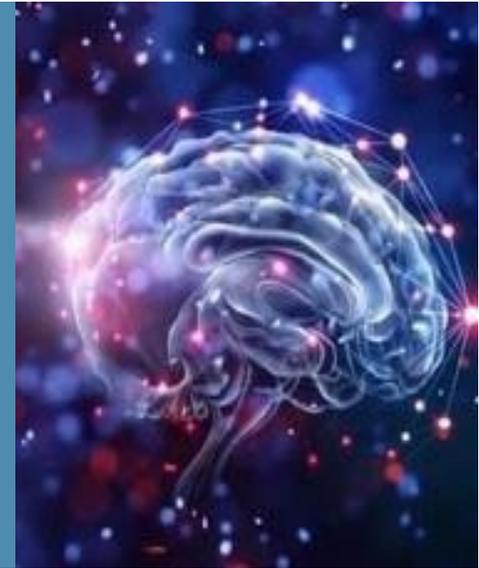
**Rete
Cardiologica**
IRCCS



rin | rete IRCCS delle neuroscienze
e della neuroriabilitazione

**PIATTAFORMA AUTOMATIZZATA
HIGH-THROUGHPUT**

**BIOMARKER E TARGET DISCOVERY
IN CAMPO NEUROLOGICO E CARDIOLOGICO**



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ



SEZIONE 1

1. Denominazione della Rete/Aggregazione richiedente:

RETE DELLE NEUROSCIENZE E DELLA NEURORIABILITAZIONE (RIN)
RETE CARDIOLOGICA (CARDIO)

Elenco IRCCS contenuto nel paragrafo 4.2
n. IRCCS aderenti alla Rete/Aggregazione: 34
n. IRCCS aderenti al progetto: 33

2. IRCCS capofila:

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Nazionale "Casimiro Mondino"

3. Titolo della proposta:

PIATTAFORMA AUTOMATIZZATA PER LA PREPARAZIONE ED ANALISI AD
ALTISSIMA RESA (HIGH THROUGHPUT) DI CAMPIONI BIOLOGICI PER BIOMARKER E
TARGET DISCOVERY IN CAMPO NEUROLOGICO E CARDIOLOGICO

4. Dati del Responsabile scientifico della proposta:

Nome e Cognome: **Fabio Blandini**
Qualifica istituzionale: Direttore Scientifico
Dipartimento/IRCCS di afferenza: IRCCS Fondazione Mondino, Istituto Neurologico Nazionale
Email: fabio.blandini@mondino.it
Tel: 0382-380202
Fax: 0382-380411

5. Dati del referente della Rete/Aggregazione:

Nome e Cognome: **Fabrizio Tagliavini**
Qualifica istituzionale: Direttore Scientifico – Presidente Rete Neuroscienze e Neuroriabilitazione
Dipartimento/IRCCS di afferenza: IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta
Email: fabrizio.tagliavini@istituto-besta.it
Tel: 02-23942335
Fax: 02-2363973

Nome e Cognome: **Elena Tremoli**
Qualifica istituzionale: Presidente Rete Cardiologica
Dipartimento/IRCCS di afferenza: IRCCS Centro Cardiologico Monzino
Email: elena.tremoli@cardiologicomonzino.it
Tel: 02-0258002334

PRESENTAZIONE E SVILUPPO DEL PROGETTO

Obiettivo bando: Promuovere lo sviluppo e l'applicazione di nuove tecnologie d'avanguardia, per rendere disponibili mezzi diagnostico-terapeutici innovativi che permettano un avanzamento delle conoscenze e un'ottimizzazione dei protocolli.

Realizzazione di una piattaforma di high throughput che combina tecnologie di dispensazione standard (Biomek) e acustiche (Echo) all'interno di un sistema integrato, coordinato da un planning scheduler (SAMI) di ultima generazione ed estremamente versatile, in grado di gestire differenti tecnologie in parallelo.

La piattaforma costituirà un supporto essenziale ed innovativo per:

- la caratterizzazione biochimica e molecolare delle patologie neurologiche e cardiovascolari, volta all'identificazione di biomarcatori e nuovi target terapeutici,
- la caratterizzazione approfondita dei fenotipi ("deep phenotyping"), per lo sviluppo di approcci di medicina di precisione.

SVILUPPO DEL PROGETTO

- ✓ Partecipazione al Bando (con firma accordo uso condiviso)
- ✓ Stipula della convenzione
- ✓ Avvio progetto

STEP 1

30/10/2020 - 29/12/2020

- ✓ Nomina del RUP- Provveditore Mondino (a norma DLgs. 50/2016)
- ✓ Pubblicazione sul sito dell'Istituto e su GUUE della Manifestazione di interesse
- ✓ Raccolta relazioni infungibilità ed esclusività
- ✓ Pubblicazione Lettera di invito e tutta la documentazione di gara sulla piattaforma Sintel
- ✓ Aggiudicazione della gara, emissione dell'ordine
- ✓ Invio della documentazione al Ministero e ricezione della prima rata di finanziamento (50%)

STEP 2

01/2021 - 29/12/2021

- ✓ Progettazione piattaforma

- ✓ Factory acceptance test c/o Indianapolis

- ✓ Realizzazione e collaudo della piattaforma

- ✓ Acquisizione personale

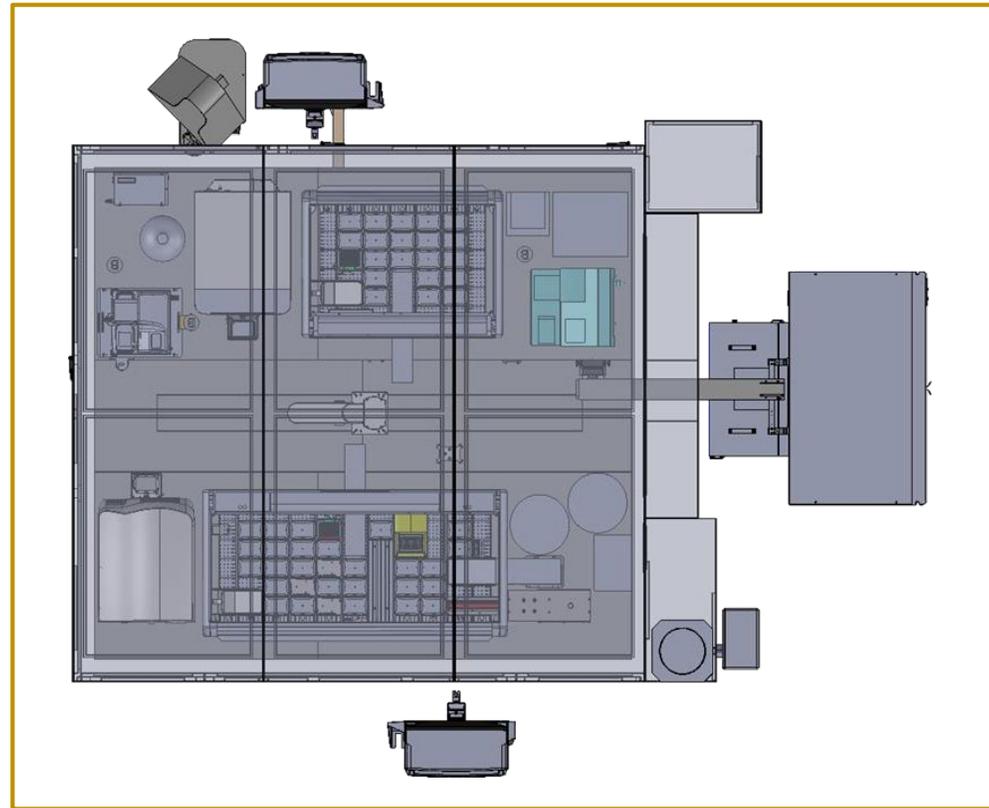
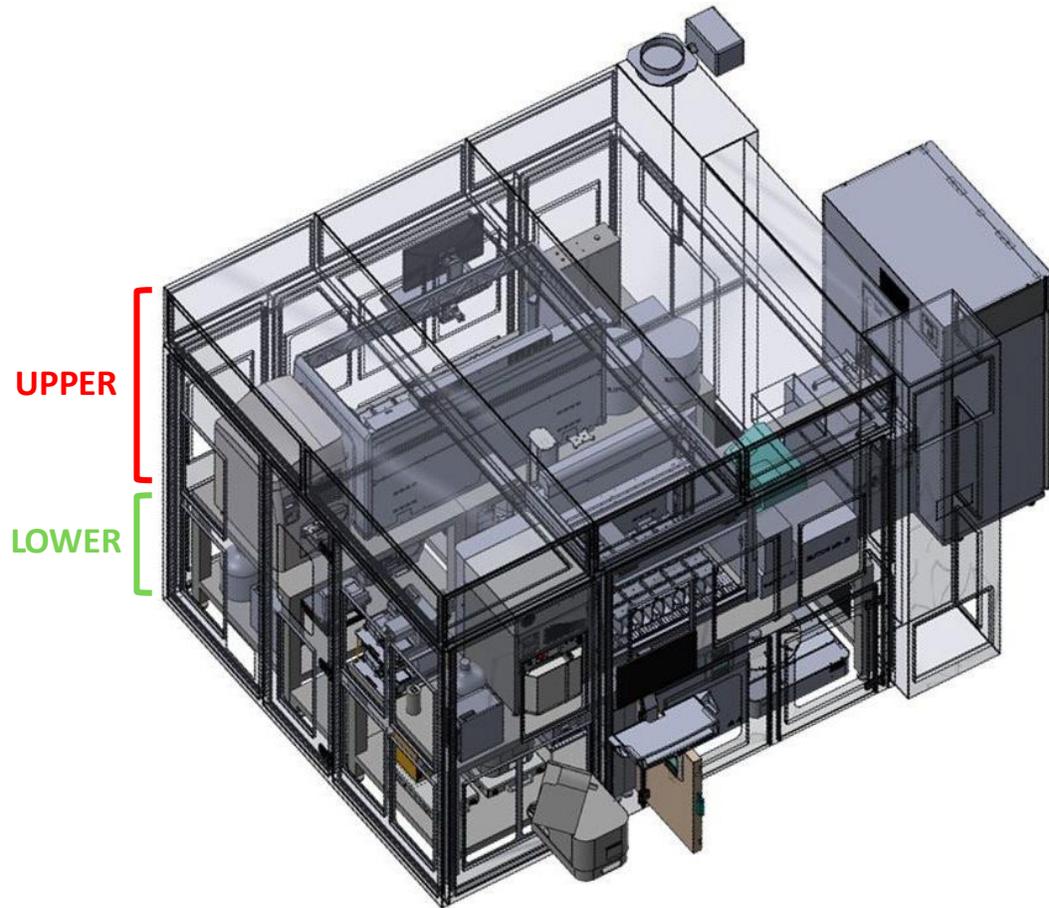
STEP 3 01/2022 - 30-06-2023

GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

Layout della Piattaforma

34 STRUMENTI

FINO A **105** PIASTRE GESTIBILI (a seconda dell'applicazione)



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

Layout Piattaforma – UPPER LEVEL

Labcyte Echo 650

(Liquid handling su base acustica)

- Range di dispensazione: 2,5 nL – 5 uL

MultiDrop Combi

(Dispenser di reagenti)

- Dispensa almeno 8 reagenti differenti,
- Range di dispensazione: 0,5 - 2500uL,
- Supporta micropiastre e tubi,
- Capacità di recupero dei liquidi.

Labcyte Echo 525

(Liquid handling su base acustica)

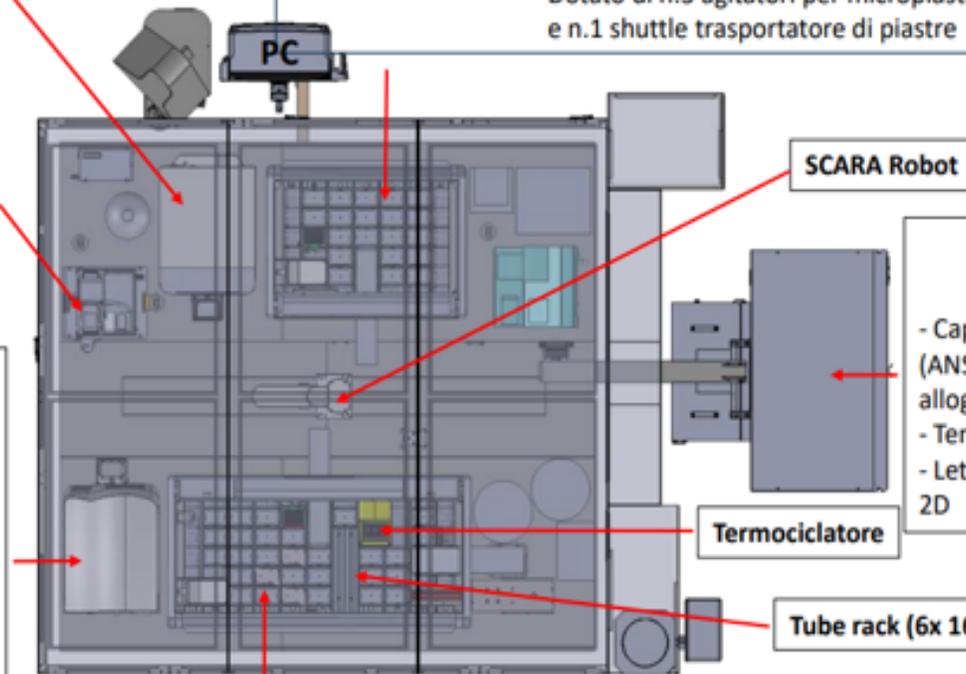
- Dispensazione senza contatto diretto
- Range di dispensazione: 25 nL – 5 uL
- Capacità di adattarsi alle proprietà del fluido
- Trasferimento "da qualsiasi pozzetto verso qualsiasi pozzetto"
- Capacità di trasferimento di fluidi di natura differente
- Accuratezza di trasferimento: <10% di deviazione dal volume target
- Precisione di trasferimento: <8% CV

<https://www.beckman.com/resources/videos/scientific/echo-acoustic-technology>

Biomek i5 MC-384

(Liquid handling)

- Piano di lavoro da 25 posizioni,
- Testata di dispensazione da 384 canali,
- N.1 pinza in grado di accedere a tutte le posizioni di lavoro
- Dotato di n.3 agitatori per micropiastre a temperatura regolabile e n.1 shuttle trasportatore di piastre



SCARA Robot

Liconic STT 100

(Congelatore)

- Capacità di alloggiare piastre (ANSI/SBS) e tubi (0,2 e 5 mL), alloggiati in rack,
- Temperatura: -20°C - 0°C
- Lettore di codici a barre 1D e 2D

Termociclatore

Tube rack (6x 16 tubi)

Biomek i7 MC-96

(Liquid handling)

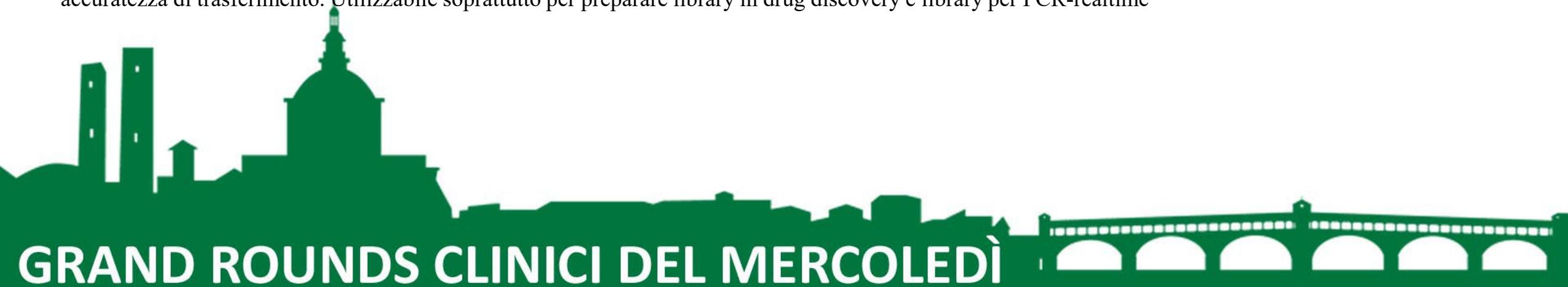
- Piano di lavoro da 45 posizioni,
- Doppia testata di dispensazione (8 canali + 96 canali),
- N.2 pinze in grado di accedere a tutte le posizioni di lavoro,
- Dotato di n.3 agitatori per micropiastre a temperatura regolabile, n.1 shuttle, trasportatore di piastre e n.1 estrattore in fase solida a pressione positiva

- **Biomek i7 MC-96** (liquid handling): piano di lavoro da 45 posizioni, doppia testata di dispensazione (una da 8 canali indipendenti utilizzabili sia per piastre che per singoli tube e una da 96 canali non indipendenti), due pinze in grado di accedere a tutte le posizioni di lavoro, tre agitatori (bioShake) per micropiastre a temperatura e velocità regolabile, uno shuttle per trasportare piastre e un estrattore in fase solida a pressione positiva.
- **Biomek i5 MC-384** (liquid handling): piano di lavoro da 25 posizioni, testata di dispensazione da 384 canali, una pinza in grado di accedere a tutte le posizioni di lavoro, tre agitatori (bioShake) per micropiastre a temperatura e velocità regolabile e uno shuttle per trasportare le piastre.
- **MultiDrop Combi** (dispenser di reagenti): dispensa almeno 8 reagenti differenti da serbatoi esterni con un range di dispensazione tra 0,5 - 2500uL, supporta micropiastre (da 6 a 1536 pozzetti) e tubi con capacità di recupero dei liquidi. Utilizzabile in diverse applicazioni (ELISA, test genomici, proteomici, screening farmacologici)
- **Positive Pressure (ALP)**: estrattore a pressione positiva sviluppato per utilizzare una pressione di max 7 bar. Utilizza apposite piastre filtranti e può essere utilizzato per:
 - Estrazione in fase solida, ad es. per l'estrazione di DNA/RNA
 - Preparazione del campione, per la quantificazione LC/MS di farmaci/ metaboliti e/o sostanze endogene nei liquidi biologici
 - Ultrafiltrazioni
 - Filtrazioni in sterilità

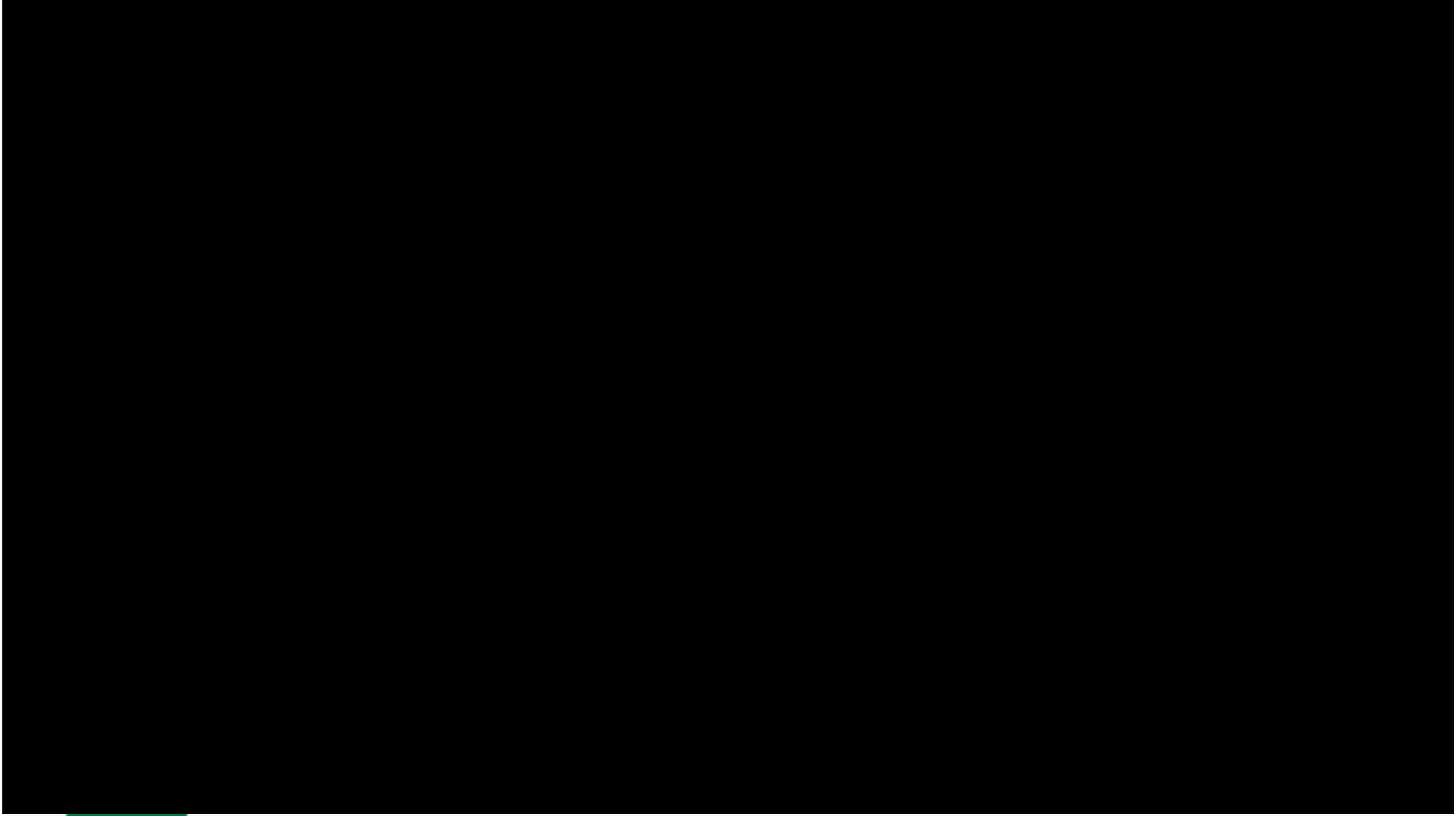
- **Tube Scan ALP Base:** base per l'inserimento di Tube Rack (6X16 tubi)
- **Liconic STT 100 (Congelatore):** capacità di alloggiare piastre (ANSI/SBS) e tubi (0,2 e 5 mL), alloggiati in rack, con temperatura tra -20°C - 0°C ed è dotato di un lettore di codici a barre 1D e 2D
- **SCARA Robot:** robot centrale con pinza per trasportare piastre, scatole di puntali in diverse posizioni, e sulle diverse strumentazioni
- **Termociclatore (Thermofisher)** (PCR, incubazione, purificazione)
- **Due Echo liquid Handler (Labcyte Echo 650; Labcyte Echo 525):** liquid handling su base acustica. Il 650 ha un range di dispensazione da 2,5 nL – 5 uL mentre il 525 ha un range di 25 nL – 5 uL.

L'Echo Liquid Handler prevede una tecnologia innovativa con risultati più rapidi e accurati rispetto ai metodi di pipettaggio tradizionali. Le onde sonore espellono goccioline di dimensioni precise da una sorgente su una micropiastre, un vetrino o un'altra superficie sospesa sopra la sorgente.

L'Echo Liquid Handler può trasferire fino a 750.000 campioni al giorno su piastre da 384, 1536 e 3456 pozzetti, vetrini e dispositivi microfluidici. Si tratta di una dispensazione senza contatto diretto con capacità di adattarsi alle proprietà del liquido garantendo accuratezza di trasferimento. Utilizzabile soprattutto per preparare library in drug discovery e library per PCR-realtime



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

Layout Piattaforma – LOWER LEVEL

Thermo Cytomat Microplate Hotel 10

- Capacità: > 200 micropiastre (ANSI/SBS)
- Due punti di accesso, con accesso rapido (< 10s)

Thermo Cytomat 10C (Incubatore automatizzato)

Thermo VisionMate 96 (Letto di codice a barre)

Scinomix SciPrint

Brooks Xpeel (De-sigillante per micropiastre)

Agilent PlateLoc (Sigillante per micropiastre)

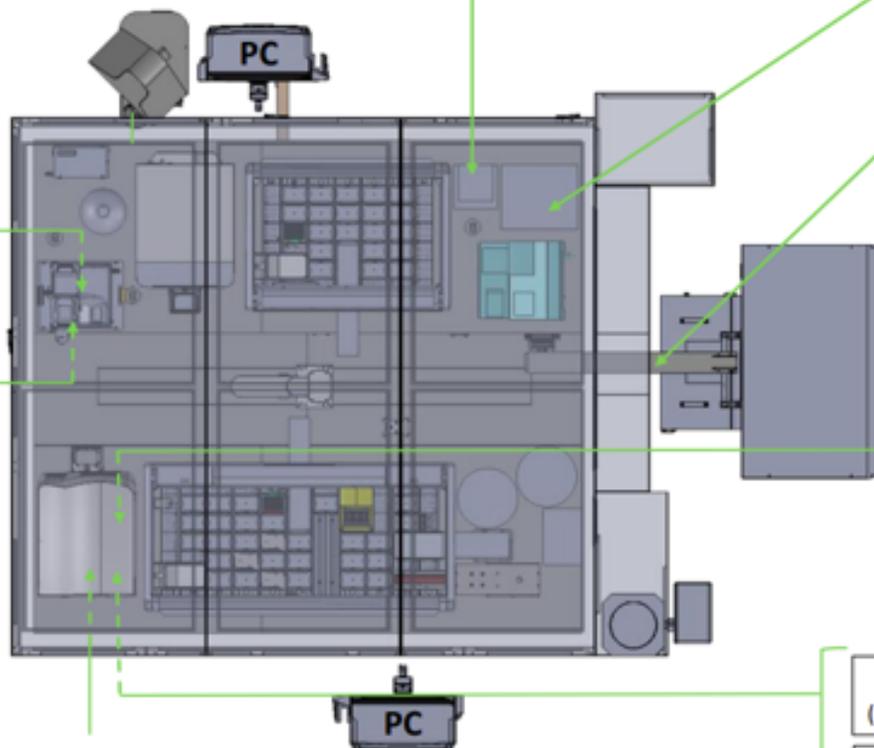
Agilent Vspin (Centrifuga)

- velocità massima: 3000 rpm/1000g
- capacità di alloggiare almeno due micropiastre o due rastrelliere (rack) per tubi

ELX406 Washer

- Capacità di dispensazione di almeno 3 reagenti
- Tecnologia di dispensazione basata su pompa peristaltica e a siringa
- Range di dispensazione: 500nL-3000uL/pozzetto (pompa peristaltica) e 3-3000uL/pozzetto (pompa a siringa)
- Flusso di dispensazione regolabile e presenza di tubi angolati
- Compatibilità sia con biglie magnetiche che di polistirene
- Funzione di shaking e soaking

Beckman Coulter Lidding /De-Lidding Station



- **Agilent Vspin.** Centrifuga per due piastre o due rastrelliere (rack) per tubi con una velocità massima di 3000 rpm/1000g
- **Thermo Cytomat 10C.** Incubatore automatizzato per piastre (colture cellulari)
- **Thermo Cytomat Microplate Hotel 10.** Può ospitare più di 200 micropiastre (ANSI/SBS), ma anche scatole di puntali. Ha due punti di accesso, con accesso rapido, per scara robot per trasportarle nelle varie postazioni stabilite dai protocolli
- **Thermo VisionMate 96** Lettore di codice a barre per piastre
- **Agilent PlateLoc** Sigillante per micropiastre
- **Brooks Xpeel** De-sigillante per microspiastrre
- **FluidX IntelliXcap 96 Screw Top Tube Rack Decapper.** Postazione per aprire microtubi
- **Beckman Coulter Lidding /De-Lidding Station.** Postazione per aprire e chiudere piastre, scatole puntali
- **ELX406 Washer** con una capacità di dispensazione di almeno 3 reagenti. Si tratta di una tecnologia di dispensazione basata su pompa peristaltica e a siringa. Il range di dispensazione è di 500nL-3000uL/pozzetto (pompa peristaltica) e 3-3000uL/pozzetto (pompa a siringa). Ha un flusso di dispensazione regolabile e la presenza di tubi angolati. Ha una compatibilità sia con biglie magnetiche che di polistirene e ha una funzione di shaking e soaking. Utile per il lavaggio e la dispensazione nei saggi standard (cellulari e ELISA), oltre alla separazione biomagnetica e per i protocolli di filtrazione a vuoto
- **Scinomix SciPrin** stampante per etichette barcoddate per piastre





GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

SAMI

SAMI è progettato per fornire un'automazione completa di sistemi integrati di liquid handling ed il controllo di tutti i processi e dispositivi necessari in una vasta gamma di applicazioni.

SAMI crea programmi basati sull'utilizzo dei dati relativi ai campioni in un ambiente di programmazione ottimizzato.

- Il planning scheduler ottimizza la sequenza delle azioni da eseguire per una tempistica coerente
- I dispositivi possono essere integrati e utilizzare i dati a livello di piattaforma/pozzetto per supportarvi nelle vostre decisioni
- Variazione del metodo con sottoprocessi per un maggiore controllo e risparmio di tempo
- Metodi e processi possono essere modificati in base ai dati in tempo reale
- Sofisticata gestione degli errori durante lo sviluppo del metodo e il tempo di esecuzione
- Funzionalità di Gantt Chart per l'esecuzione del flusso di lavoro in tempo reale e la gestione dei colli di bottiglia



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ

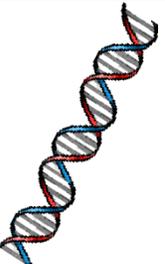
Target selection & validation

Discovery

Development



Studies of Disease Mechanisms

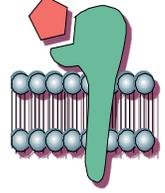


Molecular Studies



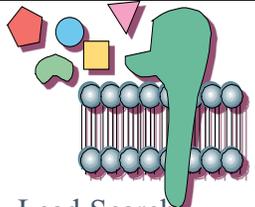
Animal Studies

- relevant species
- transgenic KO/KI mice
- conditional KOs
- agonists/antagonists
 - antibodies
 - antisense
 - RNAi



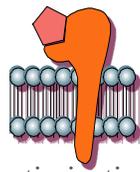
Target

- receptor; -ion channel; -transporter;
- enzyme; - signalling molecule



Lead Search

- Develop assays (use of automation)
- Chemical diversity
- Highly iterative process



Lead optimization

- selectivity
- efficacy in animal models
- tolerability: AEs mechanism-based or structure-based?
- pharmacokinetics
- highly iterative process



Drug Candidate safety testing



Human Studies Phases I,II, III



Drug Approval and Registration

Target Selection & Validation

- ✓ Define the unmet medical need (disease)
- ✓ Understand the molecular mechanism of the disease
- ✓ Identify a therapeutic target in that pathway (e.g gene, key enzyme, receptor, ion-channel, nuclear receptor)
- ✓ Demonstrate that target is relevant to disease mechanism using genetics, animal models, lead compounds, antibodies, RNAi, etc.

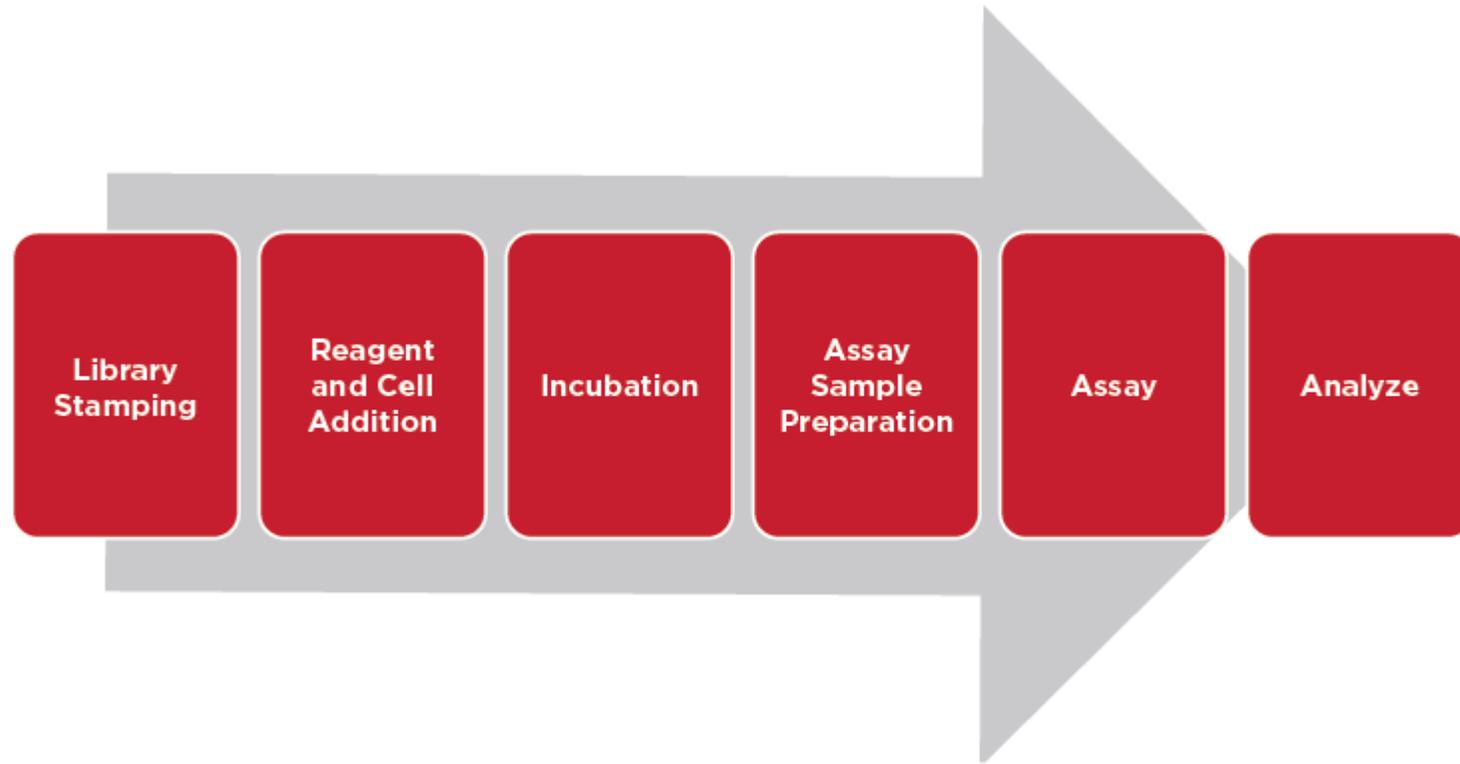


Discovery

- ✓ Develop an assay to evaluate activity of compounds on the target
 - *in vitro* (e.g. enzyme assay)
 - *in vivo* (animal model or pharmacodynamic assay)
- ✓ Identify a lead compound
 - ✓ screen collection of compounds (“compound library”)
 - ✓ compound from published literature
 - ✓ screen Natural Products
 - ✓ structure-based design (“rational drug design”)
- ✓ Optimize to give a “proof-of-concept” molecule—one that shows efficacy in an animal disease model
- ✓ Optimize to give drug-like properties—pharmacokinetics, metabolism, off-target activities
- ✓ Safety assessment



Typical High Throughput Screening Workflow



APPLICAZIONI DELLA PIATTAFORMA

APPLICAZIONI GIA' IMPLEMENTATE:

- Preparazione library per RNAseq (sequenziamento mRNA, smallRNA, RNA target, lncRNA) in high throughput
- Preparazione del campione per la quantificazione LC/MS di farmaci/ metaboliti e/o sostanze endogene nei liquidi biologici (utilizzo del sistema di positive pressure ALP con piastre filtranti)

APPLICAZIONI IN FASE DI IMPLEMENTAZIONE

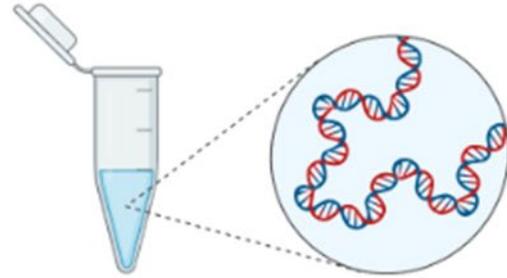
- Saggi ELISA automatizzati in high throughput
- Saggi cellulari per la valutazione di effetti di composti/farmaci, funzioni effettrici anticorpali

POTENZIALI APPLICAZIONI

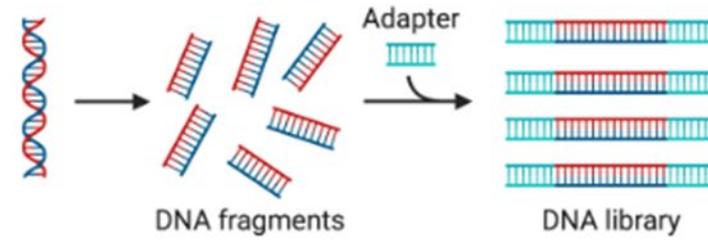
- Isolamento e produzione di anticorpi monoclonali
- Identificazione di target terapeutici per lo sviluppo di terapie personalizzate
- Isolamento di vescicole extracellulari da fluidi biologici e surnatanti cellulari
- Screening cellulare di miRNAs e siRNA

Workflow RNA-seq

Step 1:
RNA extraction

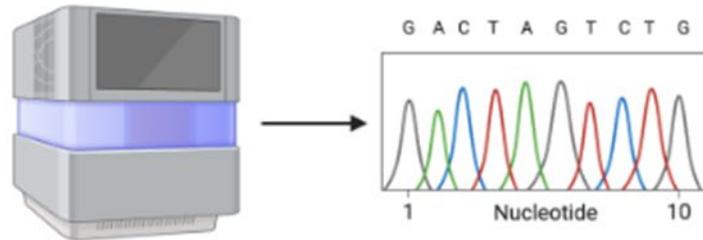


Step 2:
Library preparation

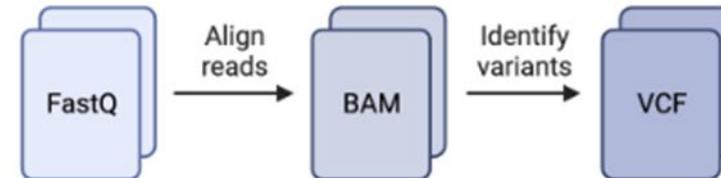


**Next Generation
Sequencing Workflow**

Step 3:
Sequencing



Step 4:
Analysis



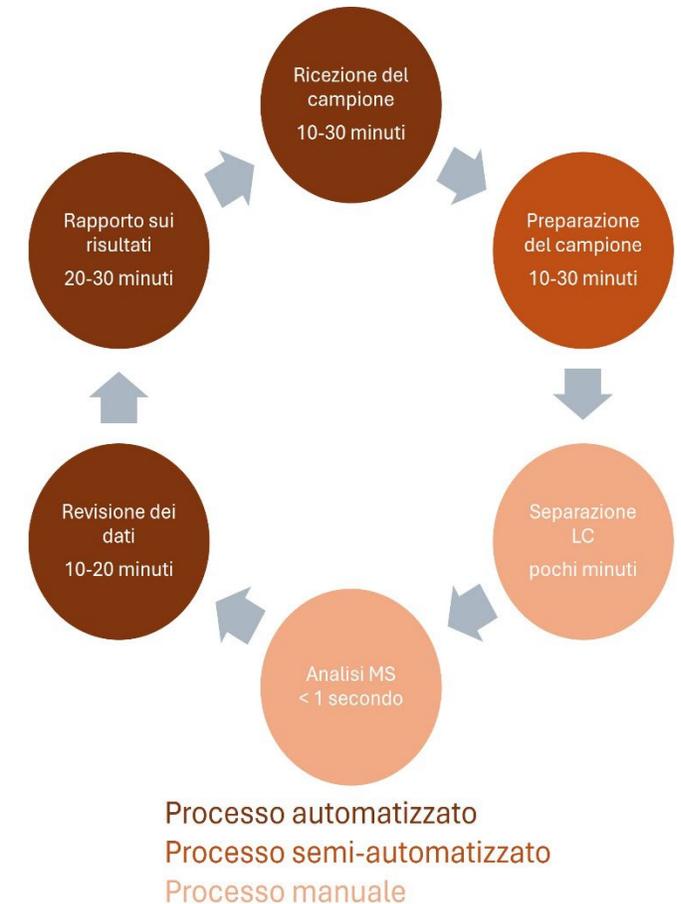
LC-MS/MS Workflow

La fase di analisi MS in sé è abbastanza automatizzata, tuttavia, ci sono numerosi punti critici durante il flusso di lavoro LC-MS/MS legati ai processi manuali

La preparazione dei campioni prevede una o più fasi affinché i campioni siano compatibili con LC-MS/MS

L'estrazione liquido-liquido o l'estrazione in fase solida possono essere impiegate singolarmente o in combinazione con altre tecniche (precipitazione delle proteine).

Queste procedure possono essere condotte manualmente o in modo semiautomatico utilizzando sistemi di pipettaggio automatici o SPE on-line



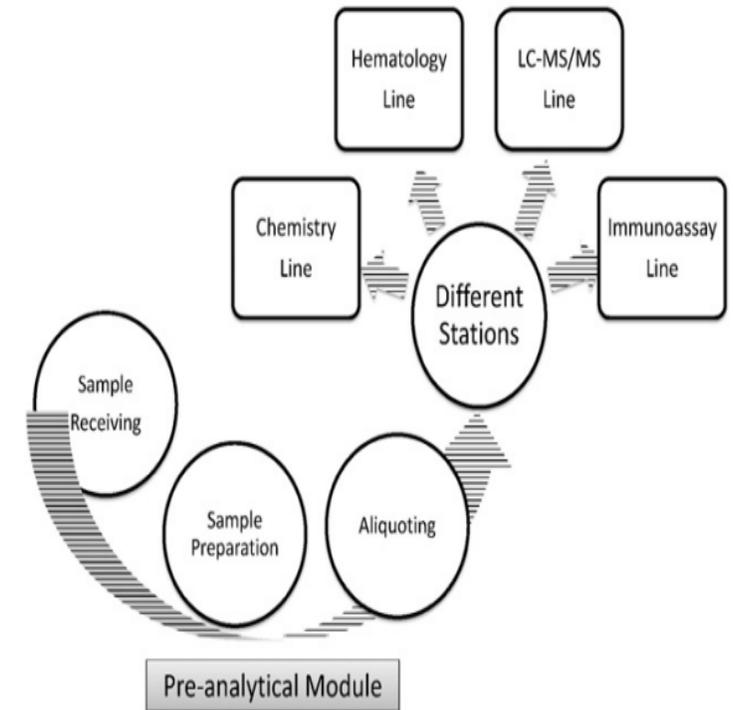
LC-MS/MS Workflow: Prospettive Future nell'Automazione

Lo sviluppo e la validazione dei test in LC-MS richiedono un investimento significativo di tempo e competenze

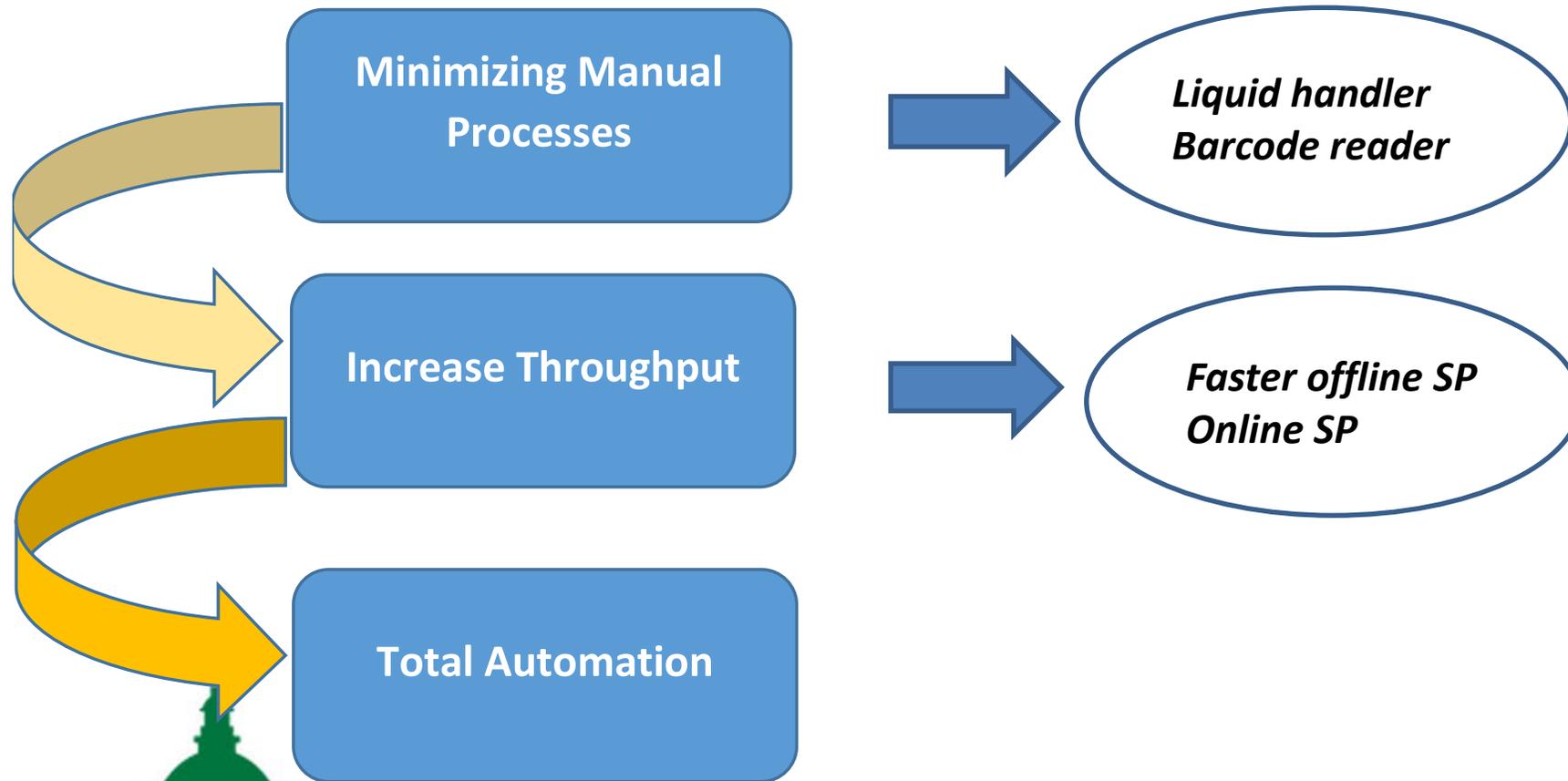
I test sviluppati in laboratorio e l'automazione possono coesistere in quanto l'automazione può offrire diversi vantaggi:

Riduzione dei costi: l'automazione consente ai laboratori di ridurre le spese associate a personale altamente qualificato

Maggiore efficienza: i laboratori possono elaborare volumi di campioni più elevati (scoperta di biomarcatori) ed eseguire test di routine in modo più efficiente (monitoraggio terapeutico), con conseguente miglioramento globale del flusso di lavoro.



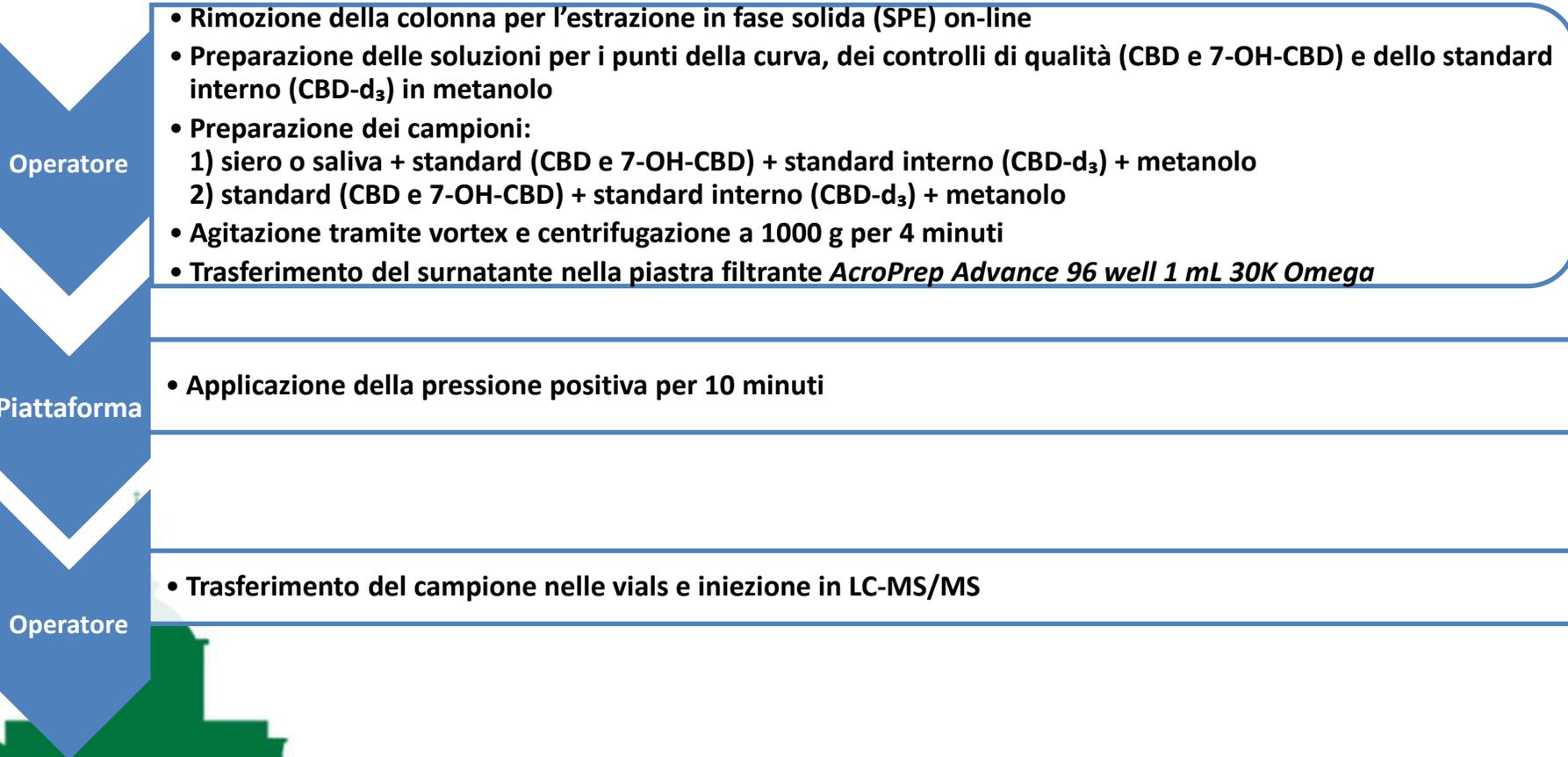
Streamlining Manual Process for Biomarker Discovery



HTS E ANALISI IN LC-MS/MS -1-

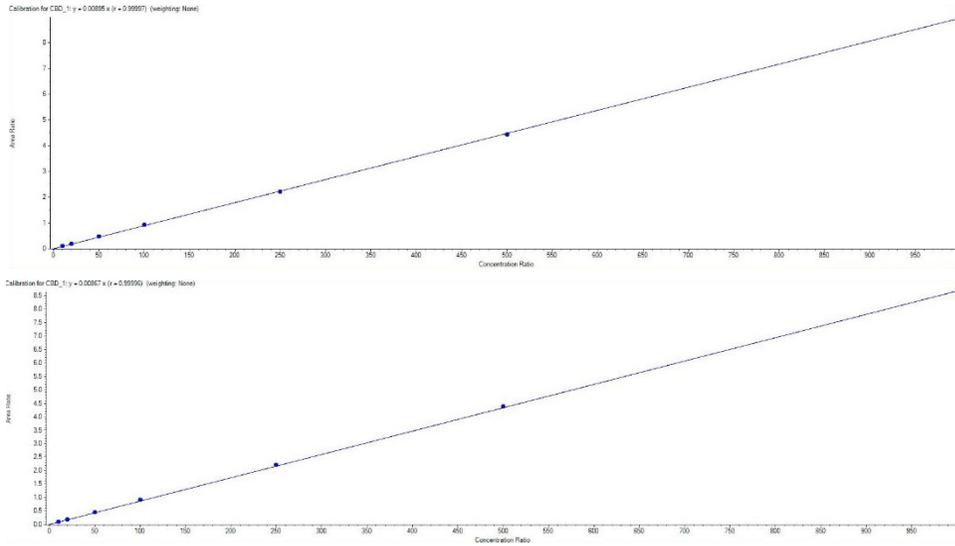
DETERMINATION OF CANNABIDIOL AND 7-HYDROXY-CANNABIDIOL IN SERUM AND SALIVA SAMPLES BY LC-MS/MS: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE SAMPLE PREPARATION METHOD IN THE HTS SYSTEM

PROVE INIZIALI

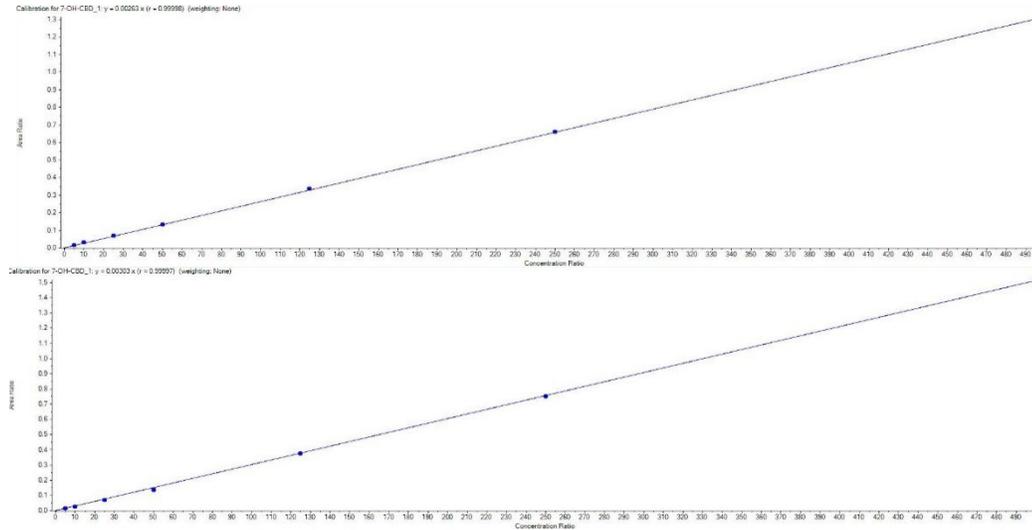


RISULTATI -1-

CBD SIERO E SALIVA



7-OH-CBD SIERO E SALIVA



Concentration (ng/mL)	Measured (ng/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
Serum CBD (n=4)			
35 (QC1)	35.1±3	8.4	100.3
350 (QC2)	347.9±3.1	0.9	99.4
750 (QC3)	693±47.2	6.8	92.4
Saliva CBD (n=4)			
35 (QC1)	37.6±1.3	3.6	107.3
350 (QC2)	344.5±7.5	2.2	98.4
750 (QC3)	744.3±24.4	3.3	99.2

Concentration (ng/mL)	Measured (ng/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
Serum 7-OH-CBD (n=4)			
17.5 (QC1)	17.7±1.1	6.2	101.1
175 (QC2)	163.3±5.0	3.1	93.3
375 (QC3)	333.2±18.3	5.5	88.8
Saliva 7-OH-CBD (n=4)			
17.5 (QC1)	19.7±0.3	1.6	112.4
175 (QC2)	197.7±2.8	1.4	112.9
375 (QC3)	417.9±3.9	0.9	111.4

Recovery %	Serum CBD	Serum CBD-d ₃	Saliva CBD	Saliva CBD-d ₃	Serum 7-OH-CBD	Serum CBD-d ₃	Saliva 7-OH-CBD	Saliva CBD-d ₃
QC1	86%	103%	85%	98%	80%	103%	100%	98%
QC2	84%	87%	77%	83%	67%	87%	86%	83%
QC3	78%	80%	75%	73%	66%	80%	87%	73%

HTS E ANALISI IN LC-MS/MS -2-

DETERMINATION OF CANNABIDIOL AND 7-HYDROXY-CANNABIDIOL IN SERUM AND SALIVA SAMPLES BY LC-MS/MS: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE SAMPLE PREPARATION METHOD IN THE HTS SYSTEM

Operatore

- Preparazione delle soluzioni per i punti della curva, dei controlli di qualità (CBD e 7-OH-CBD) e dello standard interno (CBD-d₃) in metanolo

Piattaforma

- Preparazione del campione: siero o saliva + standard (CBD e 7-OH-CBD) + standard interno (CBD-d₃) + metanolo
- Agitazione tramite vortex e centrifugazione a 1000 g per 4 minuti
- Trasferimento del surnatante nella piastra filtrante *AcroPrep Advance 96 well 1 mL 30K Omega*
- Applicazione della pressione positiva per 10 minuti

Operatore

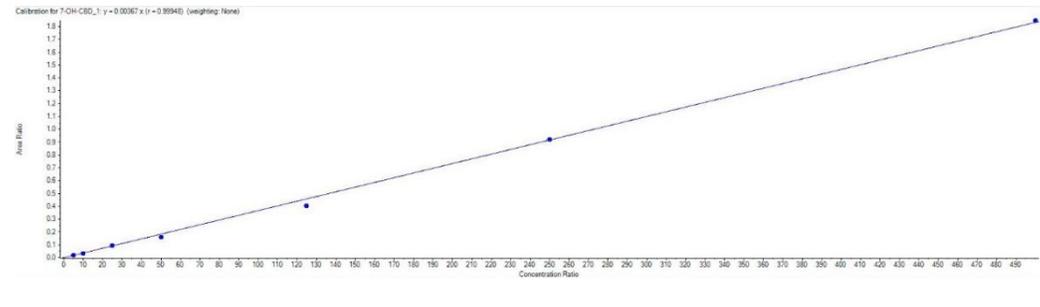
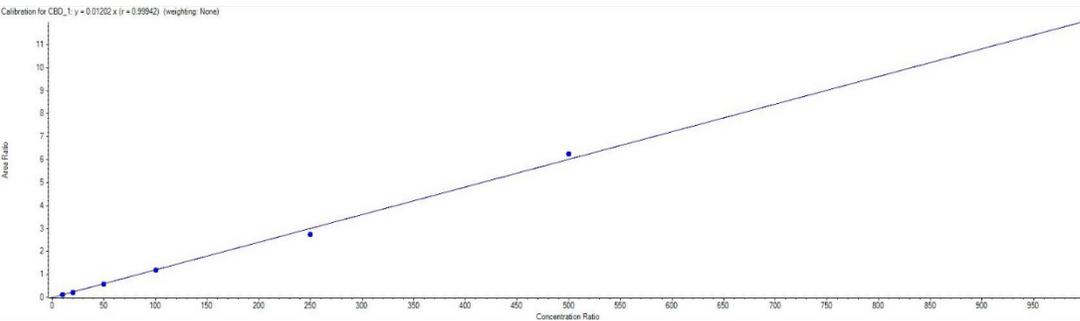
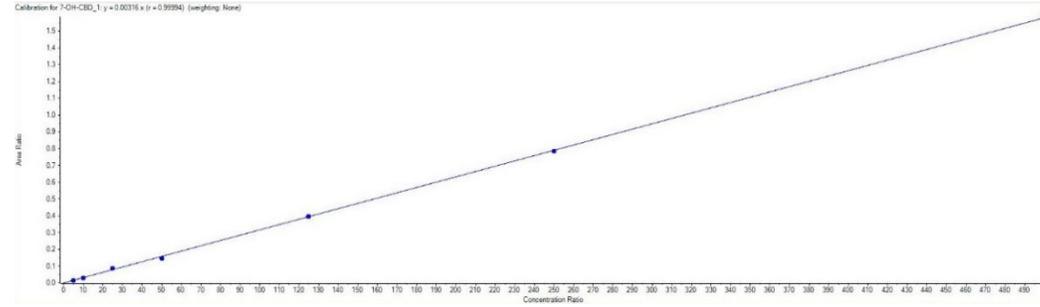
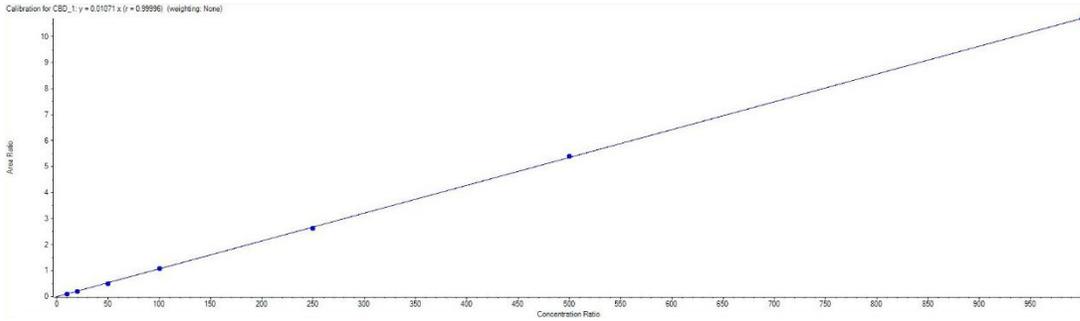
- Trasferimento del campione nelle vials e iniezione in LC-MS/MS

PROVE RIPETUTE
CON UTILIZZO
COMPLETO DELLA
PIATTAFORMA

RISULTATI -2-

CBD SIERO (2 CURVE)

7-OH-CBD SIERO (2 CURVE)



Concentration (ng/mL)	Measured (ng/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
Serum CBD	(n=7)	(n=8)	(n=6)
35 (QC1)	32.7±3.9	11.9	93.6
350 (QC2)	330.3±6.5	2.0	94.4
750 (QC3)	723.4±67.1	9.3	96.5

Concentration (ng/mL)	Measured (ng/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
Serum 7-OH-CBD	(n=7)	(n=8)	(n=6)
17.5 (QC1)	16.7±1.8	10.6	95.3
175 (QC2)	160.1±5.1	3.2	91.5
375 (QC3)	363.7±38.6	10.6	97.0



HTS E ANALISI IN LC-MS/MS

CONCLUSIONI

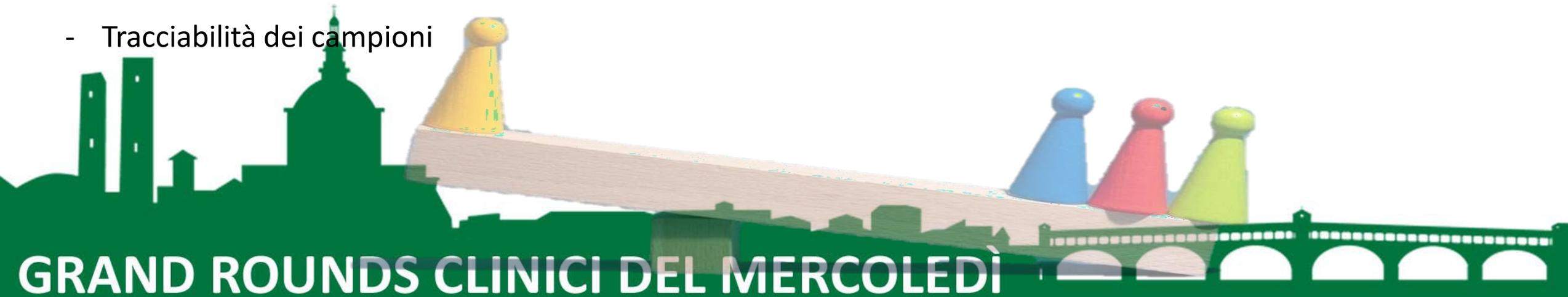
- Replicazione precisa e accurata del processo di preparazione del campione in HTS con risultati sovrapponibili alle procedure manuali o condotte in semi-automazione

PROSSIMI STEPS

- Raccolta del campione in una piastra direttamente analizzabile in LC-MS/MS o inserimento del campione dalla piastra di raccolta alle vials con l'utilizzo della piattaforma
- Sviluppo e validazione di un pannello per il dosaggio in automazione di tutti i farmaci anticrisi in diverse matrici biologiche

PIATTAFORMA AUTOMATIZZATA HIGH-THROUGHPUT: QUALI VANTAGGI?

- Processazione simultanea di un elevato numero di campioni
- Standardizzazione dei processi
- Miglioramento dell'efficienza nel processamento dei campioni (tempi ridotti garantendo precisione e accuratezza elevati)
- Riduzione delle potenziali influenze ambientali fra differenti postazioni di lavoro/operatori → Riduzione della variabilità analitica = garanzia di riproducibilità dei risultati
- Elevati standard di qualità
- Tracciabilità dei campioni





FONDAZIONE
MONDINO

Istituto Neurologico Nazionale
a Carattere Scientifico | IRCCS



Rete
Cardiologica
IRCCS



rin | rete IRCCS delle neuroscienze
e della neuroriabilitazione

Gianni Bonelli

Roberto Bergamaschi

Fabio Blandini

Silvia Cerri

Chiara Boiocchi

Stella Gagliardi

Jessica Garau

Matteo Gastaldi

Pietro Businaro

Michela Palmisani

Orietta Pansarasa

Gloria Castellazzi

Elena Tremoli

Lorenzo Menicanti

Gualtiero Colombo

Cristina Banfi

Fabrizio Tagliavini

Raffaele Lodi

To: biohit@mondino.it



GRAND ROUNDS CLINICI DEL MERCOLEDÌ