

MALATTIA (Referente di patologia)	GENE	METODICA	Tempi di refertazione	DNA minimo richiesto	Codice NT	Controlli interni di qualità
Condrodiplasia Metafisaria, Schmidt - CDM (Dott.ssa Elena Pedrini)	COL10A1	SD	6 mesi	15 µg totali	915125	(2)
Displasia Epifisaria Multipla -DEM Pseudoacondroplasia (Dott.ssa Elena Pedrini - Dott.ssa Serena Corsini)	COMP	HRM + SD	6 mesi	10 µg totali	915293	(3)
	MATN3	DHPLC + SD	6 mesi		915114	(2)
	SLC26A2	SD	6 mesi		915115	(2)
Esostosi Multiple -FEXS (Dott.ssa Elena Pedrini - Dott.ssa Serena Corsini)	EXT1	DHPLC + SD	4 mesi	7 µg totali	915105	(2)
	EXT2	DHPLC + SD	4 mesi		915106	(2)
	EXT1	qPCR + MLPA	3 mesi		915108	(4) e (5)
	EXT2	qPCR + MLPA	3 mesi		915109	(4) e (5)
Malattia di Caffey (Dott.ssa Margherita Maioli)	COL1A1 (esone 42)	SD	1 mese	3 µg totali	915292	(1)
Meloreostosi - MS (Dott.ssa Elena Pedrini - Dott.ssa Serena Corsini)	LEMD3	HRM + SD	6 mesi	7 µg totali	915116	(3)
						(4)
Osteogenesi Imperfetta - OIS (AD) (Dott.ssa Margherita Maioli - Dott.ssa Serena Corsini)	Col1A1	DHPLC + SD	10 mesi	20 µg totali	915110	(2)
	Col1A2	DHPLC + SD	10 mesi		915111	(2)
	Col1A1	MLPA	3 mesi		915290	(5)
	Col1A2	MLPA	3 mesi		915291	(5)
	IFITM5	SD	2 mesi		915301	(1)
Osteogenesi Imperfetta - OIS (AR) (Dott.ssa Margherita Maioli)	CRTAP	SD	4 mesi	10 µg totali	915112	(1)
	LEPRE1	SD	5 mesi		915113	(1)
	PPIB	SD	4 mesi		915297	(1)
	FKBP10	SD	5 mesi		915296	(1)
	SP7	SD	4 mesi		915299	(1)
	SERPINH1	SD	4 mesi		915298	(1)
	WNT1	SD	4 mesi		915300	(1)
	SERPINF1	SD	4 mesi		915295	(1)

MALATTIA (Referente di patologia)	GENE	METODICA	Tempi di refertazione	DNA minimo richiesto	Codice NT	Controlli interni di qualità
Osteopoichilos - BOS (Dott.ssa Elena Pedrini - Dott.ssa Serena Corsini)	LEMD3	HRM + SD qPCR	6 mesi	7 µg totali	915116	(3) (4)
Morbo di Paget - PAG (Dott.ssa Elena Pedrini)	SQSTM1	SD	6 mesi	7 µg totali	915117	(1)
	TNFRSF11A	SD	6 mesi		915118	(1)
Paget giovanile - PAG (Dott.ssa Elena Pedrini)	TNFRSF11B	SD	6 mesi	7 mg totali	915119	(1)
Poliartrite - PAR (Dott.ssa Francesca Ponti)	COL11A2	SD	12 mesi	20 µg totali	915124	(1)
Pseudocondroplasia - PSACH (Dott.ssa Elena Pedrini - Dott.ssa Serena Corsini)	COMP	HRM + SD	6 mesi	10 µg totali	915293	(3)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO I e II (Dott.ssa Francesca Ponti - Dott.ssa Serena Corsini)	Col5A1	HRM + SD qPCR	9 mesi	20 µg totali	915121	(1) (3) e (4)
	Col5A2	HRM + SD qPCR	9 mesi		915122	(1) (3) e (4)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO IV (Dott.ssa Francesca Ponti)	COL3A1	DHPLC + SD	12 mesi	20 µg totali	915120	(2)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO VII (Dott.ssa Margherita Maioli)	Col1A1 (esone 6)	HRM + SD qPCR	2 mesi	3 µg totali	915294	(3) e (4)
	Col1A2 (esone 6)					
Sindrome di Li-Fraumeni - SFS (Dott.ssa Francesca Ponti - Dott.ssa Serena Corsini)	p53	SD	6 mesi	7 µg totali	915107	(1)
	p53	MLPA	3 mesi		915289	(4) e (5)
Sindrome di Marshall - MRS (Dott.ssa Francesca Ponti)	COL11A1	SD	12 mesi	20 µg totali	915123	(1)
Sindrome di Stickler - STL (Dott.ssa Francesca Ponti)	COL11A1	SD	12 mesi	20 µg totali	915123	(1)
	COL11A2	SD	12 mesi		915124	(1)
RICERCA DI MUTAZIONE IDENTIFICATA IN CASO DI FAMILIARITÀ		SD	1 mese	1 µg totale	912901	(1)
ESTRAZIONE DNA			1 mese		91365	

**(1) Sequenziamento diretto (SD)**

**PCR pre-sequenziamento.** gel di agarosio: campioni separati per elettroforesi e confrontati con un marker di peso molecolare, ed un bianco (NTC – No Template Control controllo rispetto a contaminazioni aspecifiche).

**Sequenziamento.** I campioni sequenziati completamente e le sequenze lette e confrontate con la sequenza di riferimento scaricata dal database ufficiale (“Entrez Gene” da PubMed-National Library of Medicine). La lettura viene effettuata su entrambi i filamenti.

**(2) dHPLC+SD**

**PCR pre-dHPLC.** *caricamento di tutti i campioni* + con un controllo negativo (DNA wild type-WT), ed un bianco (NTC).

**Corsa ed analisi in dHPLC.** I campioni analizzati per lo stesso amplicone vengono caricati assieme ad un controllo WT per confrontare i chromatogrammi ed evidenziare eventuali profili anomali.

**PCR pre-sequenziamento** (effettuato su una seconda aliquota di DNA se disponibile) gel di agarosio: campioni separati per elettroforesi e confrontati con un marker di peso molecolare, ed un bianco (NTC).

**Corsa ed analisi in Sequenziamento.** Le sequenze riscontrate mutate in dHPLC sono lette e confrontate con la sequenza di riferimento scaricata dal database di riferimento (“Entrez Gene” da PubMed-National Library of Medicine). La lettura viene effettuata da due operatori.

**(3) HRM+SD**

**Amplificazione e analisi HRM.** Ad ogni analisi HRM si aggiunge un controllo negativo (DNA WT) . (ogni campione analizzato in doppio)

L'avvenuta amplificazione è evidenziata dalle curve di fluorescenza; la correttezza dell'amplicone è confermata della curva di melt (i picchi ottenuti devono essere tutti sovrapponibili e centrati sulla corretta temperatura di fusione dell'amplicone).

Tutti i risultati (profilo di fusione dell'amplicone) HRM sono calibrati rispetto al controllo WT (oppure un controllo incrociato su un numero ampio di campioni contemporaneamente amplificati.)

**Corsa ed analisi in Sequenziamento.** Le sequenze riscontrate diverse dal WT in HRM sono lette e confrontate con la sequenza di riferimento scaricata dal database di riferimento (“Entrez Gene” da PubMed-National Library of Medicine).

La lettura viene effettuata in doppio.

**(4) REAL TIME qPCR**

**Amplificazione e analisi qPCR.** Ad ogni analisi Real Time si aggiunge un controllo negativo (DNA WT) ed un bianco (NTC). (ogni campione analizzato in doppio)

L'avvenuta amplificazione viene evidenziata dalle curve di fluorescenza; la correttezza dell'amplicone è confermata della curva di melt (i picchi ottenuti devono essere tutti sovrapponibili e centrati sulla corretta temperatura di fusione dell'amplicone). Al momento dell'analisi  $\Delta\Delta Ct$  tutti i risultati (quantificazione relativa) vengono calibrati rispetto al controllo WT.

## (5) MLPA

**Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.** Ad ogni analisi MLPA si aggiunge un controllo negativo (DNA WT) ed un bianco (NTC). All'interno di ogni Kit sono presenti controlli di qualità interni che indicano se la concentrazione di DNA del campione è adeguata, se è avvenuta la denaturazione e se la reazione della ligasi è stata completata. Il sistema, inoltre, analizza i picchi relativi a ciascun amplificato, solo se sono tutti presenti e marcati correttamente. L'analisi viene effettuata in doppio.

Redazione: Manuela Locatelli, Serena Corsini

Approvazione : Luca Sangiorgi