

MALATTIA	GENE	METODICA	Tempi di refertazione	Codice NT	Controlli interni di qualità
Condrodiplasia Metafisaria, Schmidt	COL10A1	SD	6 mesi	915125	(2)
Displasia Epifisaria Multipla - Pseudoacondroplasia	COMP	HRM + SD	6 mesi	915293	(3)
	MATN3	DHPLC + SD	6 mesi	915114	(2)
	SLC26A2	SD	6 mesi	915115	(2)
Esostosi Multiple	EXT1	DHPLC + SD	4 mesi	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	COL1A1 (esone 42)	SD	1 mese	915292	(1)
Meloreostosi	LEMD3	HRM + SD	6 mesi	915116	(3)
					(4)
Osteogenesi Imperfetta	Col1A1	DHPLC + SD	10 mesi	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	CRTAP	SD	4 mesi	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)
	TMEM38B	SD	4 mesi	contattare laboratorio	(1)
	BMP1	SD	6 mesi	contattare laboratorio	(1)
	PLOD2	SD	6 mesi	contattare laboratorio	(1)
	CREB3L1	SD	5 mesi	contattare laboratorio	(1)
	LRP5	SD	7 mesi	contattare laboratorio	(1)
	PLS3	SD	5 mesi	contattare laboratorio	(1)
Ipofosfatasia	ALPL	SD	5 mesi	contattare laboratorio	(1)

MALATTIA	GENE	METODICA	Tempi di refertazione	Codice NT	Controlli interni di qualità
Osteopoichilosi	LEMD3	HRM + SD qPCR	6 mesi	915116	(3)
					(4)
Morbo di Paget	SQSTM1	SD	6 mesi	915117	(1)
	TNFRSF11A	SD	6 mesi	915118	(1)
Paget giovanile	TNFRSF11B	SD	6 mesi	915119	(1)
Poliartrite	COL11A2	SD	12 mesi	915124	(1)
Pseudoacondroplasia	COMP	HRM + SD	6 mesi	915293	(3)
Sindrome di Ehlers-Danlos	Col5A1	HRM + SD qPCR	9 mesi	915121	(1)
					(3) e (4)
	Col5A2	HRM + SD qPCR	9 mesi	915122	(1)
					(3) e (4)
Sindrome di Ehlers-Danlos	COL3A1	DHPLC + SD	12 mesi	915120	(2)
Sindrome di Ehlers-Danlos	Col1A1 (esone 6)	HRM + SD qPCR	2 mesi	915294	(3) e (4)
	Col1A2 (esone 6)				
Sindrome di Li-Fraumeni	p53	SD	6 mesi	915107	(1)
	p53	MLPA	3 mesi	915289	(4) e (5)
Sindrome di Marshall	COL11A1	SD	12 mesi	915123	(1)
Sindrome di Stickler	COL2A1	SD	8 mesi	contattare laboratorio	(1)
	COL11A1	SD	12 mesi	915123	(1)
	COL11A2	SD	12 mesi	915124	(1)
RICERCA DI MUTAZIONE IDENTIFICATA IN CASO DI FAMILIARITÀ		SD	1 mese	912901	(1)
DIAGNOSI PRENATALE (corredata di esclusione di contaminazione materna)		SD	15 giorni	912901	(1)
ESTRAZIONE DNA			1 mese	91365	
<p><b>(1) Sequenziamento diretto (SD)</b></p> <p><b>PCR pre-sequenziamento.</b> 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).</p> <p><b>Sequenziamento.</b> 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.</p>					

**(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 cromatogrammi 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 dalla 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 dalla curva di melt (i picchi ottenuti devono essere tutti sovrapponibili e centrati sulla corretta temperatura di fusione dell'amplicone). Al momento dell'analisi  $\Delta\Delta C_t$  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