

MALATTIA	GENE	METODICA	Operatore	Tempi di refertazione	Controlli interni di qualità
Condrodiplasia Metafisaria, Schmidt - CDM	COL10A1	SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(2)
Displasia Epifisaria Multipla -DEM	COMP	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	EP	6 mesi	(3)
			SC		(4)
	MATN3	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(2)
	SLC26A2	SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(2)
Esostosi Multiple -FEXS	EXT1	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	EP	4 mesi	(2)
	EXT2	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	EP	4 mesi	(2)
	EXT1	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
	EXT2	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
Malattia di Caffey	COL1A1 (esone 42)	SEQUENZIAMENTO	MM	1 mese	(1)
Meloreostosi - MS	LEMD3	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	EP	6 mesi	(3)
			SC		(4)
Metacondromatosi - MET (esclusione Esostosi Multiple)	EXT1	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	EP	4 mesi	(2)
	EXT2	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	EP	4 mesi	(2)
	EXT1	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
	EXT2	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
Morbo di Paget - PAG	SQSTM1	SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(1)
	TNFRSF11A	SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(1)
Osteogenesi Imperfecta - OIS (AD)	Col1A1	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	MM	10 mesi	(3)
			SC		(4)
	Col1A2	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	MM	10 mesi	(3)
			SC		(4)
	Col1A1	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
	Col1A2	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
	IFITM5	SEQUENZIAMENTO	MM	2 mesi	(1)

MALATTIA	GENE	METODICA	Operatore	Tempi di refertazione	Controlli interni di qualità
Osteogenesi Imperfetta - OIS (AR)	CRTAP	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
	LEPRE1	SEQUENZIAMENTO	MM	5 mesi	(1)
	PPIB	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
	FKBP10	SEQUENZIAMENTO	MM	5 mesi	(1)
	SP7	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
	SERPINH1	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
	WNT1	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
	SERPINF1	SEQUENZIAMENTO	MM	4 mesi	(1)
Osteopoichilosi - BOS	LEMD3	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	EP	6 mesi	(3)
			SC		(4)
Paget giovanile - PAG	TNFRSF11B	SEQUENZIAMENTO	EP	6 mesi	(1)
Polartrite - PAR	COL11A2	SEQUENZIAMENTO	FP	12 mesi	(1)
Pseudoacondroplasia - PSACH	COMP	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	EP	6 mesi	(3)
			SC		(4)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO I e II	Col5A1	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	FP	9 mesi	(3)
	Col5A2	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	FP		(1)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO IV	COL3A1	DHPLC + SEQUENZIAMENTO	FP	12 mesi	(2)
Sindrome di Ehlers-Danlos - EDS TIPO VII	Col1A1 (esone 6)	HRM + SEQUENZIAMENTO REAL TIME	MM	2 mesi	(3) e (4)
	Col1A2 (esone 6)				
Sindrome di Li-Fraumeni - SFS	p53	SEQUENZIAMENTO	FP	6 mesi	(1)
	p53	REAL TIME + MLPA	SC	3 mesi	(4) e (5)
Sindrome di Marshall - MRS	COL11A1	SEQUENZIAMENTO	FP	12 mesi	(1)
Sindrome di Stickler - STL	COL11A1	SEQUENZIAMENTO	FP	12 mesi	(1)
	COL11A2	SEQUENZIAMENTO	FP	12 mesi	(1)
Bassa statura idiopatica	SHOX	invio a centro esterno (s.orsola)			
Morbo di Madelung - MMS	SHOX	invio a centro esterno (s.orsola)			

<b>Neurofibromatosi - NF</b>	invio a centro esterno (dr. Davide Martorana, PR)				
<b>Sindrome di Charcot Marie Tooth - CMT</b>		invio a centro esterno (dr. ssa Ravasi, FE)			
<b>Sindrome di Leri-Weill</b>	SHOX	invio a centro esterno (s.orsola)			
<b>Sindrome Prader Willi Angelman -PWS</b>	SNRPN (regione cromosomica 15q11-q13)	invio a centro esterno (Roma)			
<b>Sindrome di Sotos -SOT</b>	invio a centro esterno (dr.ssa Baffico o dr.ssa Grasso, GE)				
<b>Artrogriposi-ATG</b>	Counselling genetico				
<b>Morbo di Maffucci - MAF</b>	Counselling genetico				
<b>Morbo di Ollier - OM</b>	Counselling genetico				

**(1) Sequenziamento diretto**

**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. (campioni completamente negativi analizzati nuovamente in sequenziamento)

**(2) dHPLC+sequenziamento**

**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. (campioni completamente negativi analizzati nuovamente in sequenziamento)

**(3) HRM+sequenziamento**

**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. (campioni completamente negativi corsi di nuovo in dHPLC o sequenziamento)

**(4) REAL TIME**

**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.

Redazione: Manuela Locatelli, Serena Corsini

Approvazione : Luca Sangiorgi