

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA- ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Ferrara



Procedure diagnostiche nel Laboratorio di Fisiopatologia Endocrina: dal campione biologico al referto

Dr.ssa Stefania Bruni

CPS_ Tecnico di Laboratorio Biomedico

Laboratorio di Fisiopatologia Endocrina

Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant'Anna di Ferrara



Diagnostica Molecolare svolta nel Laboratorio di Fisiopatologia Endocrina

MEN 1
RET
AIP
P27

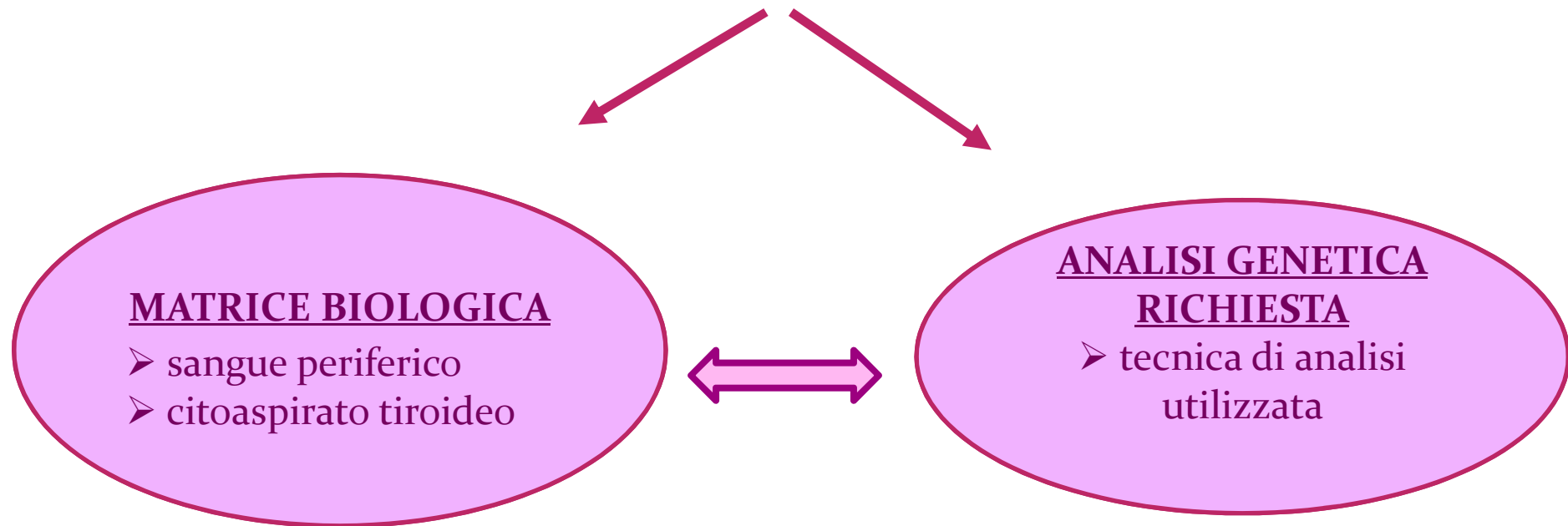
Ricerca di mutazioni germinali in campioni di
sangue periferico

BRAF
RAS

Ricerca di mutazioni somatiche in campioni di
citoaspirato tiroideo



Qual è il destino del *campione biologico* e quali sono le diverse fasi a cui viene sottoposto in laboratorio?



SANGUE PERIFERICO

In laboratorio arrivano **2 provette con tappo viola** accompagnate da un **modulo di richiesta di analisi genetica**.



RICHIESTA DI ANALISI GENETICA RET			
NUMERO PAZIENTE: _____			
NOME _____			
COGNOME _____			
DATA DI NASCITA _____			
INDIRIZZO: _____			
TELEFONO: _____			
OSPEDALE DI PROVENIENZA: _____			
REPARTO: _____			
MEDICO RICHIEDENTE: _____			
(Firma) _____			
TELEFONO E FAX: _____			
DATA PRELIEVO: _____			
QUADRO CLINICO			
Carcinoma Midollare della Tiroide	Feocromocitoma dx / sx o bilaterale	Adenoma / Iperplasia delle paratiroidi	Neurinomi mucosi
NOTE AGGIUNTIVE: _____			
<small>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Roberta Rossi) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 237397.</small>			

} Tipo analisi genetica richiesta

} Dati anagrafici del paziente

} Medico e/o ospedale richiedente

} Quadro clinico del paziente



Modulo di richiesta analisi genetica di AIP e P27

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA AIP		
NUMERO PAZIENTE:		
NOME		
COGNOME		
DATA DI NASCITA		
INDIRIZZO:		
TELEFONO:		
OSPEDALE DI PROVENIENZA:		
REPARTO:		
MEDICO RICHIEDENTE:		
(Firma)		
TELEFONO E FAX:		
DATA PRELIEVO:		
QUADRO CLINICO		
Tumori ipofisari	Familiarità per tumori ipofisari	Altro
NOTE AGGIUNTIVE:		
<p>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Maria Chiara Zatelli) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 237272.</p>		

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA P27			
NUMERO PAZIENTE:			
NOME			
COGNOME			
DATA DI NASCITA			
INDIRIZZO:			
TELEFONO:			
OSPEDALE DI PROVENIENZA:			
REPARTO:			
MEDICO RICHIEDENTE:			
(Firma)			
TELEFONO E FAX:			
DATA PRELIEVO:			
QUADRO CLINICO			
Neoplasie tiroidee	Tumori Ipofisari	Tumori neuroendocrini	Altro
NOTE AGGIUNTIVE:			
<p>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Maria Chiara Zatelli) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 239618.</p>			

Modulo di richiesta analisi genetica di MEN₁ e RET

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA MEN ₁			
<input type="checkbox"/> HRM		<input type="checkbox"/> Analisi di microdelezioni	
NUMERO PAZIENTE: _____			
NOME _____			
COGNOME _____			
DATA DI NASCITA _____			
INDIRIZZO: _____			
TELEFONO: _____			
OSPEDALE DI PROVENIENZA: _____			
REPARTO: _____			
MEDICO RICHIEDENTE: _____			
(Firma) _____			
TELEFONO E FAX: _____			
DATA PRELIEVO: _____			
QUADRO CLINICO			
Iperparatiroidismo	Tumori gastroenteropancreatici	Tumori Ipofisari	Altro
NOTE AGGIUNTIVE: _____			
<p>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (Dr.ssa Maria Chiara Zatelli) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 239618.</p>			

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA RET			
NUMERO PAZIENTE: _____			
NOME _____			
COGNOME _____			
DATA DI NASCITA _____			
INDIRIZZO: _____			
TELEFONO: _____			
OSPEDALE DI PROVENIENZA: _____			
REPARTO: _____			
MEDICO RICHIEDENTE: _____			
(Firma) _____			
TELEFONO E FAX: _____			
DATA PRELIEVO: _____			
QUADRO CLINICO			
Carcinoma Midollare della Tiroide	Feocromocitoma dx / sx o bilaterale	Adenoma / Iperplasia delle paratiroidi	Neurinomi mucosi
NOTE AGGIUNTIVE: _____			
<p>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Roberta Rossi) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 237397.</p>			



PRESA IN CARICO DEL CAMPIONE

- Registrazione del campione con assegnazione di un numero progressivo;

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA RET			
NUMERO PAZIENTE: _____			
NOME _____			
COGNOME _____			
DATA DI NASCITA _____			
INDIRIZZO: _____			
TELEFONO: _____			
OSPEDALE DI PROVENIENZA: _____			
REPARTO: _____			
MEDICO RICHIEDENTE: _____			
(Firma) _____			
TELEFONO E FAX: _____			
DATA PRELIEVO: _____			
QUADRO CLINICO			
Carcinoma Midollare della Tiroide	Feocromocitoma dx / sx o bilaterale	Adenoma / Iperplasia delle paratiroidi	Neurinomi mucosi
NOTE AGGIUNTIVE: _____			
<small>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Roberta Rossi) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 237397.</small>			



assegnazione del numero progressivo

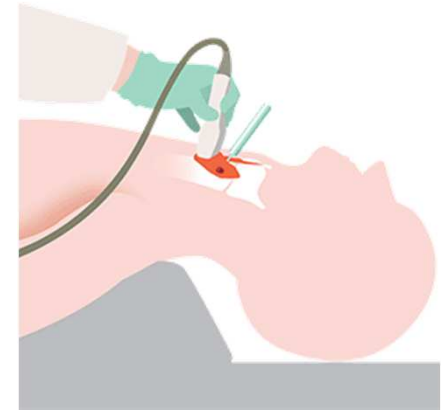
- 2 aliquote da 200 µl di sangue periferico , la restante parte viene conservata, congelata e stoccata a -80°C.



SEQUENZIAMENTO DIRETTO dei geni RET, AIP, MEN₁ e P27

CITOASPIRATO TIROIDEO

➤ La FNA (Fine Needle Aspiration Biopsy) viene eseguita in ambulatorio sotto guida ecografica;



➤ in laboratorio arriva il campione di citoaspirato tiroideo all'interno di una **provetta da 50 ml**, accompagnata da un **modulo di richiesta di analisi genetica**.



Modulo richiesta analisi genetica di BRAF e RAS

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA BRAF e RAS da eseguire mediante metodica	
<input type="checkbox"/> BRAF (discriminazione allelica)	<input type="checkbox"/> BRAF (sequenziamento)
<input type="checkbox"/> RAS	<input type="checkbox"/> NO CITOLOGIA
NUMERO PAZIENTE: _____	
NOME _____	
COGNOME _____	
DATA DI NASCITA _____	
LUOGO DI NASCITA _____	
INDIRIZZO: _____	
TELEFONO: _____	
MEDICO RICHIEDENTE: _____	
(Firma) _____	
EDALE DI PROVENIENZA: _____	
DATA AGO ASPIRATO: _____	
A PRELIEVO CITOLOGICO _____	
DIAGNOSI: _____	
RITIRO REFERTO CITOLOGICO AGO ASPIRATO _____	
TSH: _____	
FT4: _____	
FT3: _____	
ATG: _____	
ATPO: _____	

Tipo analisi genetica richiesta

Metodica utilizzata

Dati anagrafici del paziente

Medico e/o ospedale richiedente

Data esecuzione del prelievo

Profilo ormonale

Modulo richiesta analisi genetica di BRAF e RAS

FAMILIARITA':	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
DATA ECOGRAFIA:		
VOLUME TIROIDEO:		
CARATTERISTICHE DEL NODULO (sede prelievo):		
DIAMETRO:	<input type="checkbox"/> <1 cm	<input type="checkbox"/> >1 cm
CALCIFICAZIONI	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
ECOGENICITA'	<input type="checkbox"/> ISOECOGENO <input type="checkbox"/> ANECOGENO <input type="checkbox"/> IPOECOGENO <input type="checkbox"/> IPERECOGENO	
	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
A CURA DEL PERSONALE DEL LABORATORIO		
NUMERO SCHEDA:		
DIAGNOSI CITOLOGICA:		
DATA DI ACCOGLIMENTO IN LAB		
DATA DI ESTRAZIONE DNA:		
DATA DI SEQUENZIAMENTO/CRIMINAZIONE ALLELICA:		
DATA REFERTO ANALISI		
NOTE AGGIUNTIVE:		
<small>Il personale del Laboratorio garantisce un servizio di consulenza e di informazione contattando il Medico responsabile (D.ssa Roberta Rossi; D.ssa Maria Chiara Zatelli) dal Lunedì al Giovedì dalle 15:00 alle 18:00 allo 0532 237272.</small>		
PAGATO	NON PAGATO	ESENTE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Caratteristiche ecografiche del nodulo tiroideo

Dati a cura del laboratorio

PRESA IN CARICO DEL CAMPIONE

- Assegnazione del numero progressivo e registrazione in agenda;

RICHIESTA DI ANALISI GENETICA BRAF e RAS da eseguire mediante metodica	
<input type="checkbox"/> BRAF (discriminazione allelica)	<input type="checkbox"/> BRAF (sequenziamento)
<input type="checkbox"/> RAS	<input type="checkbox"/> NO CITOLOGIA
NUMERO PAZIENTE:	_____
NOME	_____
COGNOME	_____
DATA DI NASCITA	_____
LUOGO DI NASCITA	_____
INDIRIZZO:	_____
TELEFONO:	_____
MEDICO RICHIEDENTE:	_____
(Firma)	_____
EDALE DI PROVENIENZA:	_____
DATA AGO ASPIRATO:	_____
APRELIEVO CITOLOGICO	_____
DIAGNOSI	_____
RETRO REFERITO CITOLOGICO AGO ASPIRATO	_____
TSH:	_____
FT4:	_____
FT3:	_____
ATG:	_____
ATPO:	_____

 assegnazione del numero progressivo

- inizio processazione: *risospensione agoaspirato tiroideo.*

RISOSPENSIONE AGOASPIRATO TIROIDEO

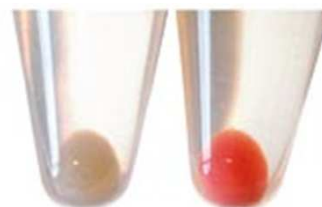
La risospensione del citoaspirato tiroideo costituisce la prima tappa della processazione del campione ed ha lo scopo di raccogliere il **pellet cellulare (tireociti)** ed eliminare le restanti componenti del campione, che possono interferire con le fasi successive di analisi.

Procedimento:

- associazione della richiesta di analisi genetica con il campione;
- trasferimento del campione in falcon da 15 ml, precedentemente numerate;
- centrifugazione a 2000 rcf x 5';



PELLET CELLULARE



- eliminazione del surnatante e risospensione del pellet cellulare in 500 µl di PBS;
- trasferimento del campione in provette da 2 ml, opportunatamente numerate, e stoccaggio del campione risospeso a -20°C.

Diagnostica molecolare del nodulo tiroideo



BRAF (V600E)

Mutazione puntiforme missenso
in eterozigosi
GAG>GTG

Sequenziamento diretto

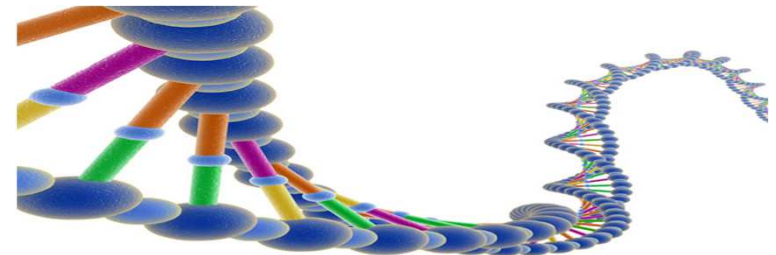
Discriminazione allelica

RAS

(N-RAS, H-RAS e K-RAS)

Mutazioni puntiformi missenso in
eterozigosi a carico dei codoni 12, 13
e 61

HRM (High Resolution Melting Analysis)





Sequenziamento diretto

Il sequenziamento degli acidi nucleici è una tecnica di analisi utilizzata in biologia molecolare nella diagnostica di laboratorio per individuare quelle modificazioni che alterano la sequenza nucleotidica di un gene, costituite da mutazioni puntiformi, SNP, piccole inserzioni e delezioni. Il sequenziamento diretto di un prodotto di PCR ha dunque lo scopo di determinare l'esatta sequenza dei nucleotidi che caratterizza il gene di interesse.

Workflow di un'analisi in sequenziamento diretto:

1. estrazione del DNA da agoaspirato tiroideo;
2. amplificazione mediante PCR;
3. separazione elettroforetica;
4. purificazione del pPCR;
5. reazione di sequenza;
6. purificazione della reazione di sequenza;
7. elettroforesi capillare mediante sequenziatore automatico;
8. lettura ed interpretazione degli elettroferogrammi.

1. *ESTRAZIONE DEL DNA DA AGOASPIRATO TIROIDEO*

L'estrazione del DNA da agoaspirato tiroideo viene eseguita con il kit *QIAamp DNA Investigator Kit* (da sangue periferico con il kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit*), mediante procedura manuale o automatizzata, utilizzando lo strumento *QIAcube*.

Metodo automatizzato consente:

- ottimizzazione dei tempi;
- standardizzazione della procedura;
- minor rischio di errore per l'operatore;
- estrazione da 1 fino a 12 campioni contemporaneamente.



- 100 µl di agoaspirato tiroideo
- 200 µl di sangue periferico

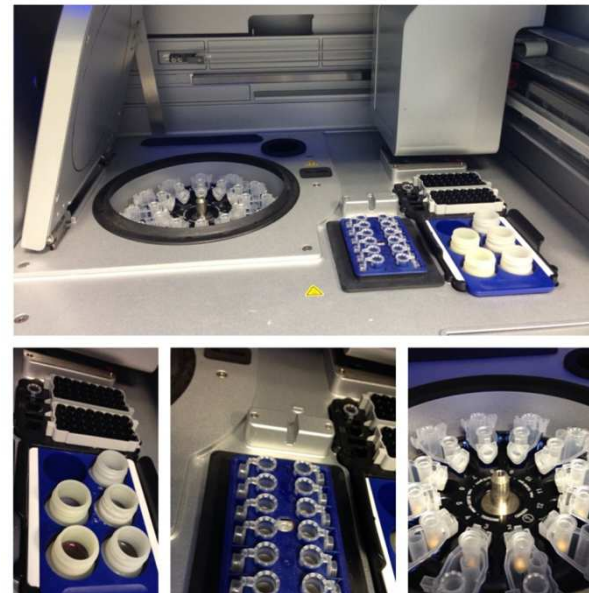


1. *ESTRAZIONE DEL DNA DA AGOASPIRATO TIROIDEO*

- Il campione da estrarre, conservato a -20°C , viene scongelato;
- si preparano e si numerano per ogni campione una provetta da 2ml (campione da estrarre) e una da 1.5 ml (DNA estratto);
- all'interno di un *rotor adapter* viene posta la provetta da 1.5 ml e una colonnina fornita dal kit, dotata di una resina che permette di trattenere l'acido nucleico estratto dai tireociti, lasciando eluire tutto il resto.
- all'interno dello strumento, vengono collocati i rotor adapter nel vano centrifuga, le provette da 2 ml nello shaker, i buffer e la proteinasi K nel vano reagenti.



Estrazione di 12 campioni in 73' ca



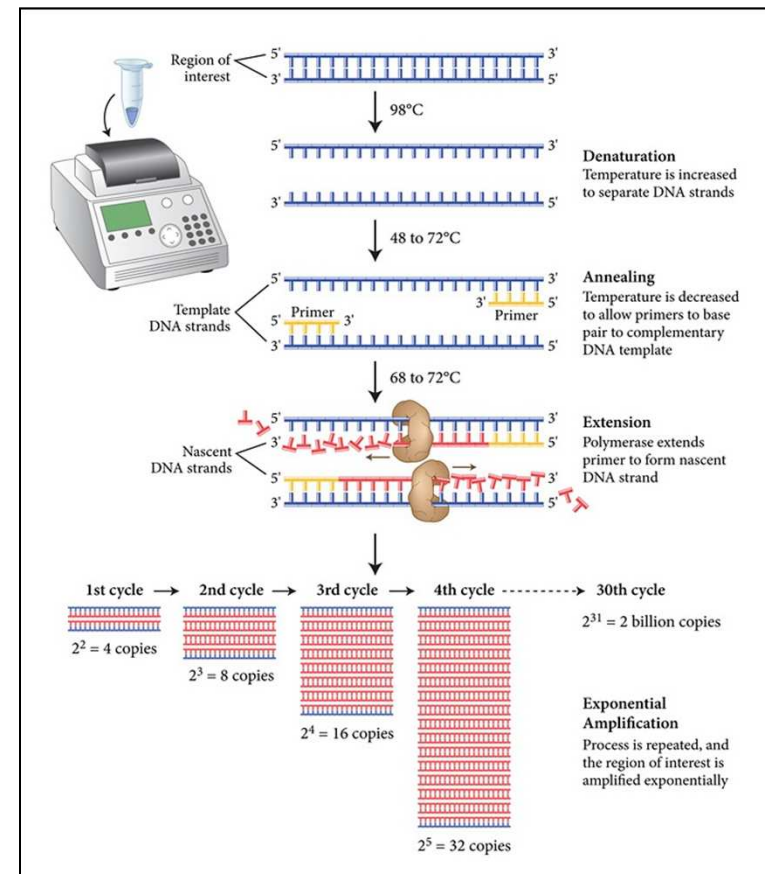
2. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante PCR

La PCR, mediante l'utilizzo di opportuni *pimers*, consente di ottenere in vitro milioni di molecole identiche di DNA, sfruttando l'attività enzimatica della *Taq DNA Polimerasi*.

➤ la PCR viene eseguita in un volume finale di 50 µl, costituiti da 40 µl di mix e 10 µl di template (10-200 ng);

	Mix x 1
10x PCR buffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	3 µl
10mM dNTPs	1 µl
Primer for (1:100)	1 µl
Primer rev (1:100)	1 µl
Taq	0,4 µl
H ₂ O	28,6 µl
Volume totale mix	40 µl
DNA	10 µl

PRIMERS	SEQUENZA	LUNGHEZZA	AMPLICONE paia di basi	ESONE
BRAFexon15_for	5' TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA 3'	23	224	15
BRAFexon15_rev	5' GGC CAA AAA TTT AATCAG TGA A 3'	22		



2. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante PCR



- Insieme ai campioni da analizzare, è opportuno eseguire un **controllo negativo** e un **controllo positivo**;
- utilizzare tutte le precauzioni finalizzate ad **evitare la contaminazione dei campioni**:
 - puntali muniti di filtro, plasticheria e H₂O DNA, RNA, DNAsi ed RNAsi free;
 - l'operatore deve indossare guanti puliti ed evitare di passare con le mani sulle provette aperte;
- il DNA e i reagenti devono essere “vortexati” e “spinnati” prima del loro utilizzo per renderli omogenei;
- la Taq DNA Polimerasi, poiché **termolabile**, deve essere conservata a -20°C;
- qualora si debbano eseguire più reazioni, è bene preparare un'unica miscela, aggiungendo in ultimo la Taq DNA Polimerasi, dispensandola prima nei campioni e solo in ultimo nel controllo negativo.



Al termine della PCR, i campioni possono essere conservati a +4°C fino al momento in cui si esegue l'elettroforesi

3. SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

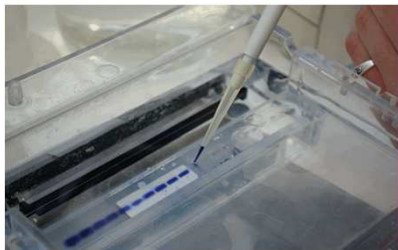
La separazione elettroforetica consente di verificare la buona riuscita della PCR. Applicando un campo elettrico, i frammenti generati migrano in base alla loro carica con velocità inversamente proporzionale al peso molecolare.

- Viene eseguita su un apparato per elettroforesi orizzontale, utilizzando un gel di agarosio al 2% p/vol (1 Kb) e TAE 50X;
- come intercalante del DNA, viene usato l'**etidio bromuro** (0,5 µg/ml);
N.B: i vapori di etidio bromuro sono neurotossici

➡ utilizzare una cappa chimica aspirante



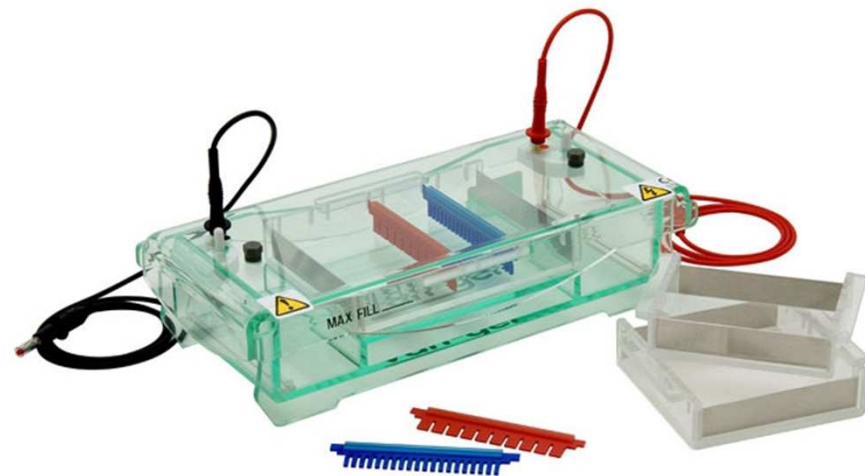
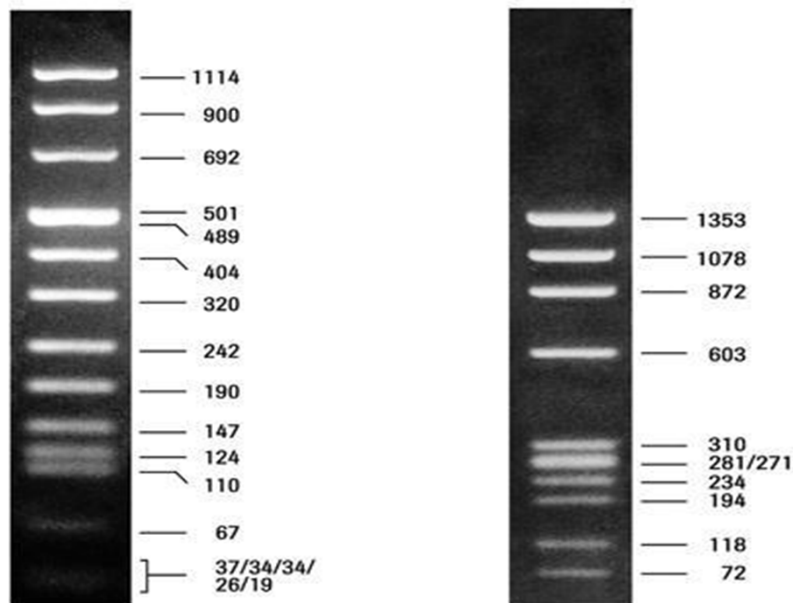
- una volta sciolto, il gel viene fatto solidificare all'interno di un supporto e mediante appositi pettini vengono ricavati i pozzetti nel gel, nei quali vengono dispensati i campioni;



- al campione prima di essere caricato viene aggiunto il **Loadin Dye** (glicerolo+blu di bromofenolo);

3. SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

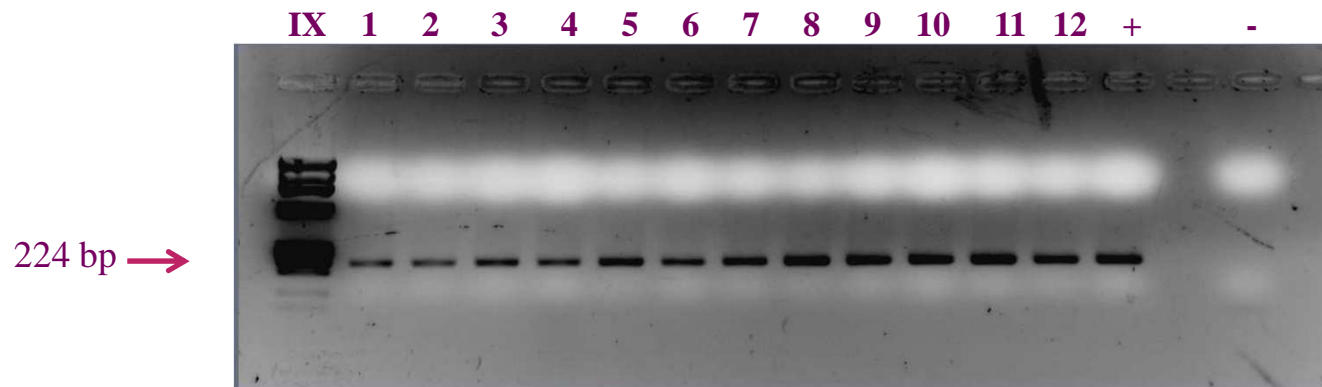
- nel gel, insieme ai campioni (5 μ l di pPCR + 1 μ l di Loading Dye), viene caricato un *marcatore di peso molecolare*;



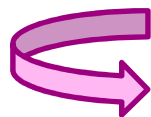
- la separazione elettroforetica avviene in presenza di TAE 1X, dopo aver applicato una differenza di potenziale tra i due elettrodi (80-130 V);

3. SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

➤ al termine della corsa elettroforetica, la lettura del gel viene eseguita al transilluminatore a raggi UV Gel Doc, utilizzando il Quantity One software.



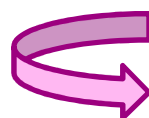
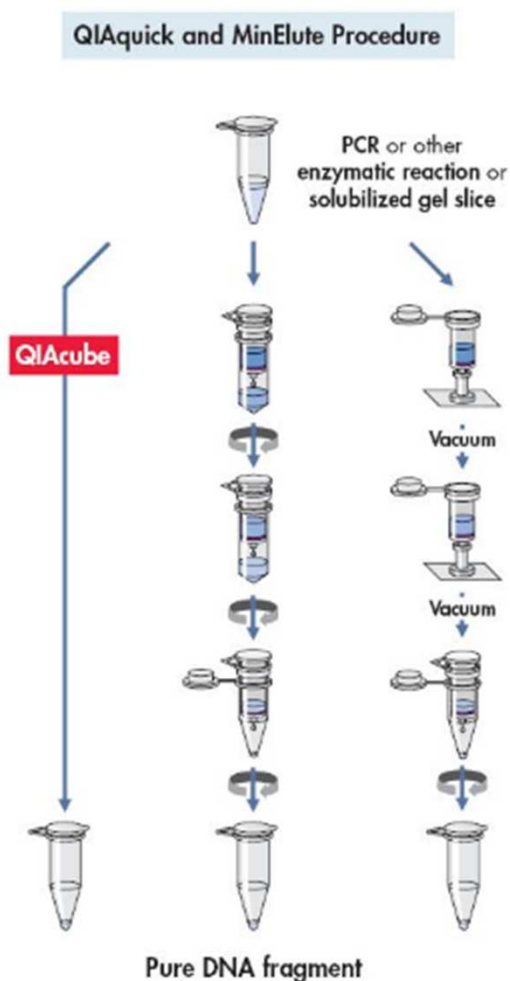
➤ registrazione del check della PCR sul quaderno di laboratorio della diagnostica: a ciascuna banda viene associato il campione biologico corrispondente



Tracciabilità del campione biologico

4. PURIFICAZIONE DEI pPCR

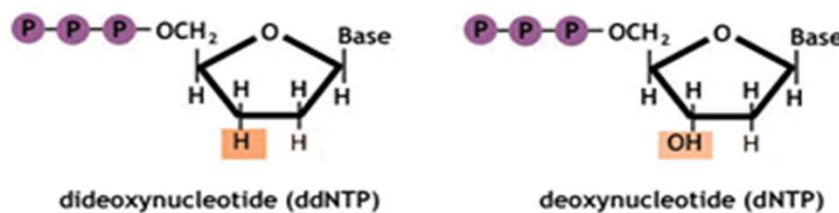
La purificazione del prodotto di PCR viene eseguita utilizzando il kit **QIAquick PCR Purification Kit** mediante procedura manuale o automatizzata utilizzando il QIAcube.



Eluizione del pPCR in 50 μ l

5. REAZIONE DI SEQUENZA

Metodo enzimatico di Sanger o dei terminatori di catena



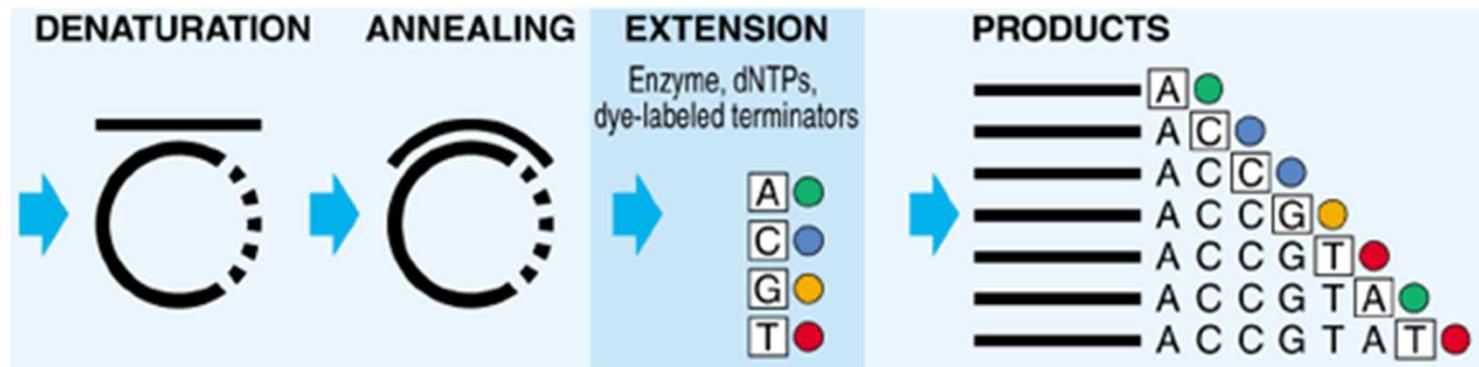
- per ogni campione vengono allestite 2 reazioni di sequenza, una per il filamento senso e una per l'antisenso;
- la reazione di sequenza viene eseguita in un volume finale di 10 µl, costituita da 1 µl di pPCR (1-20 ng) e 9 µl di mix, così costituita:

X 1 campione	
Sequencing Buffer 5X	2 µl
Sequencing RR-100	1 µl
Primer FOR o REV 2,5 µM	1 µl
H ₂ O	5 µl
Volume totale	9 µl

5. REAZIONE DI SEQUENZA



- evitare la contaminazione dei campioni: puntali con filtro, plasticheria e H₂O DNA, RNA, DNAsi ed RNAsi free, guanti puliti;
- al termine dell'allestimento della reazione di sequenza, i campioni sono caricati sul termociclatore dove avviene la sintesi dei prodotti marcati;



- i prodotti di estensione marcati devono essere protetti dalla luce, dal calore, dalle condizioni acide e dall'ossigeno per evitare la degradazione dei fluorocromi.

6. PURIFICAZIONE della REAZIONE DI SEQUENZA

La purificazione della reazione di sequenza ha lo scopo di eliminare i sali e, in particolare, i terminatori di catena non incorporati nei prodotti di estensione marcati, che possono interferire con la fase successiva di analisi.

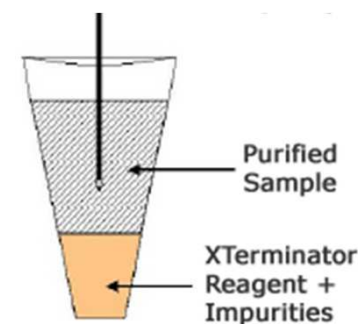
Procedura:

- eseguita in piastra da 96 well utilizzando il kit **BigDye XTerminator® Purification Kit**;

Reazione di sequenza	SAM solution	Xterminator Solution
10-20 µl	45-90 µl	10-20 µl



- la piastra viene sigillata con un film trasparente e posta a vortexare a 2000 rpm x 30';
- centrifugazione a 1000 giri x 2' → l'X terminator solution si deposita sul fondo del pozzetto della piastra, mentre i prodotti di estensione marcati rimangono in soluzione;
- il film trasparente viene eliminato, la piastra è ricoperta da un opportuno tappettino e posta tra due supporti, prima di essere caricata sul sequenziatore automatico del DNA.

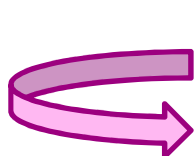


7. ELETTROFORESI CAPILLARE mediante SEQUENZIATORE AUTOMATICO



- Sequenziatore automatico *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* a 4 capillari;
- tubo capillare in silice fusa di 36 cm (frammenti di 100-500 bp) e diametro di 50 μm ;
- polimero fluido denaturante: risoluzione di 1 nt;
- iniezione elettrocinetica del campione.

- La piastra viene inserita all'interno dello strumento, gestito da un software;
- Compilazione della piastra virtuale:
 - cartella di destinazione del file su disco (Results Group);
 - protocollo di corsa da utilizzare (Instrument Protocol);
 - chimica utilizzata (Analysis Protocol).



4 campioni analizzati ogni 60' ca

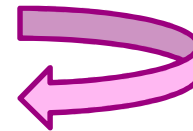
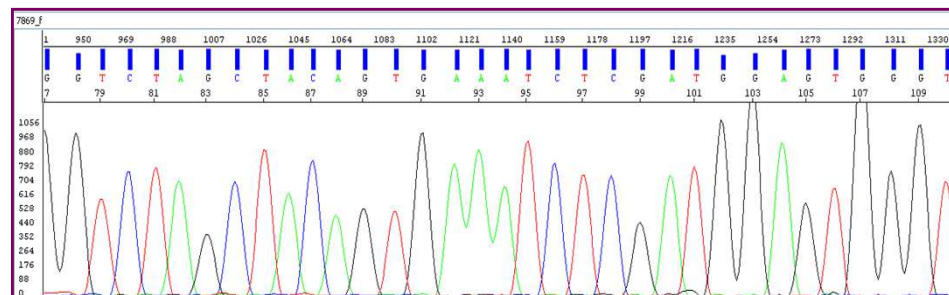
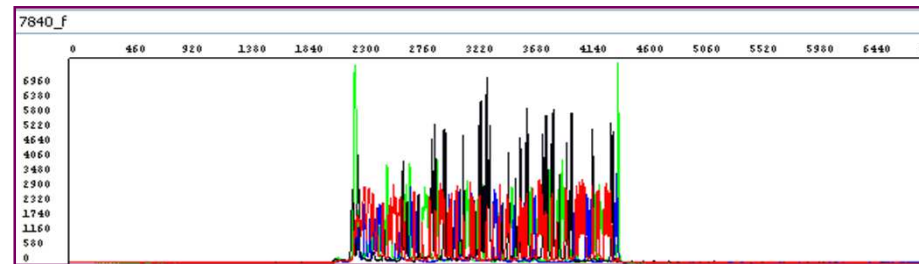
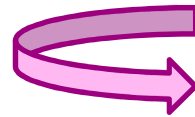
8. LETTURA ed INTERPRETAZIONE DEGLI ELETTROFEROGRAMMI

Al termine dell'elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico, i dati della corsa sono analizzati attraverso il Sequencing Analysis 5.3.1 Software.

Valutazione della qualità del segnale:

- visualizzazione dei *dati grezzi* (1000 RFU) e dell'*elettroferogramma*;
- Quality Value (QV): probabilità di errore nell'associazione di una base ad un picco

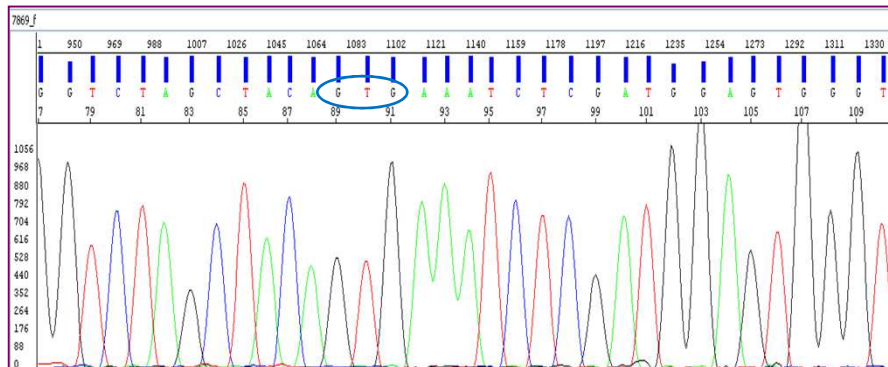
DATI GREZZI



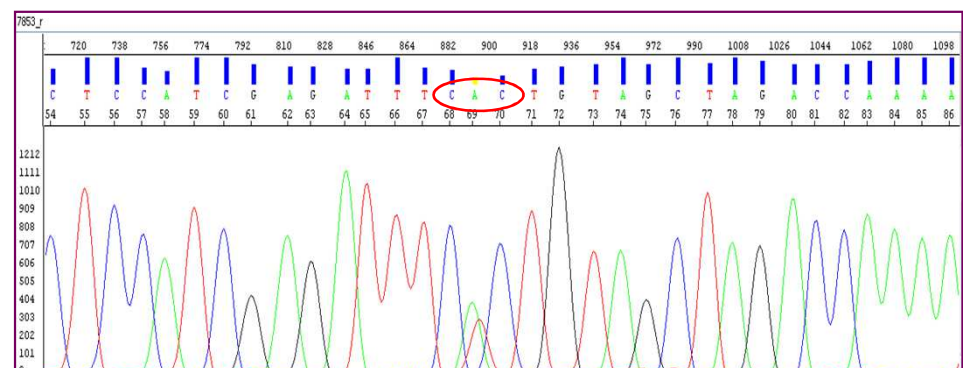
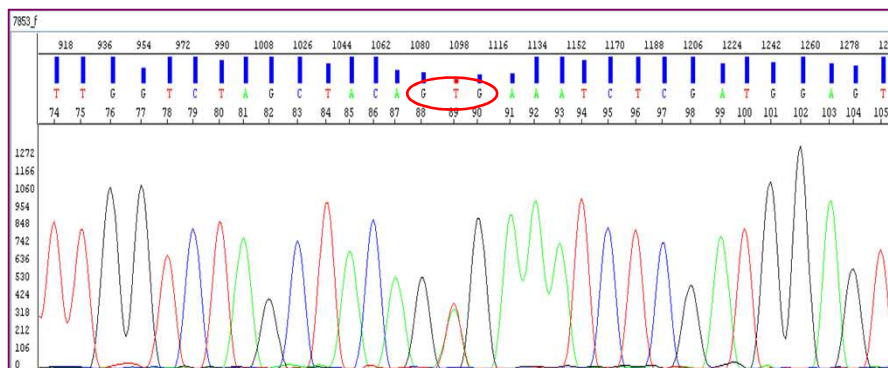
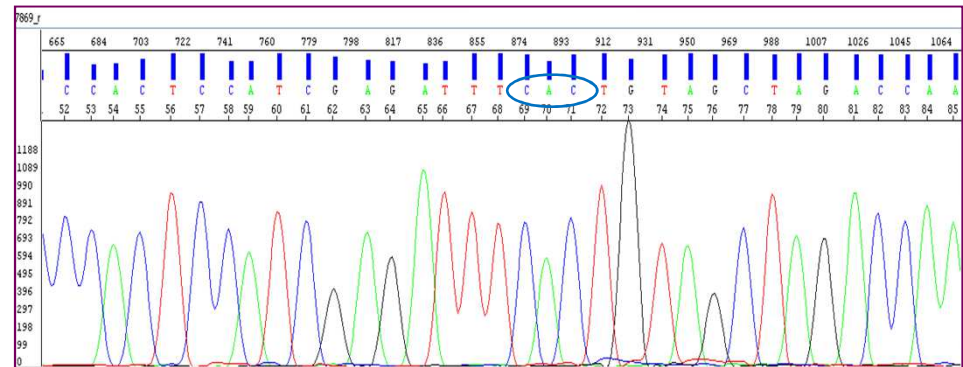
ELETTROFEROGRAMMA

8. LETTURA ed INTERPRETAZIONE DEGLI ELETTROFEROGRAMMI

Lettura dell'elettroferogramma: confrontando la sequenza nucleotidica ottenuta con quella di riferimento presente su NCBI è possibile determinare la presenza di mutazioni, il tipo e lo stato.

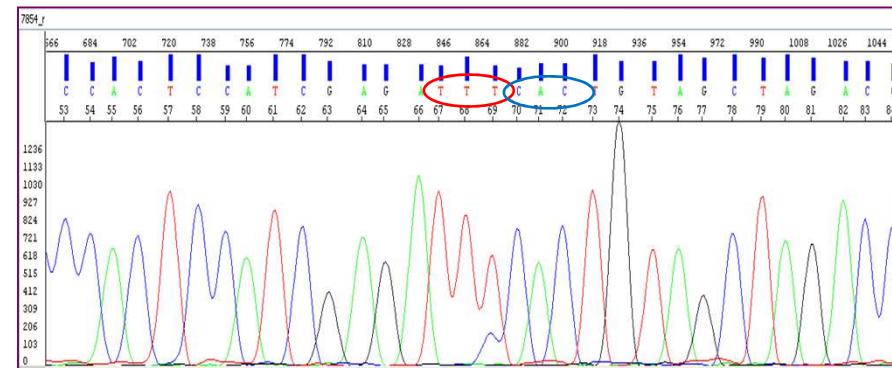
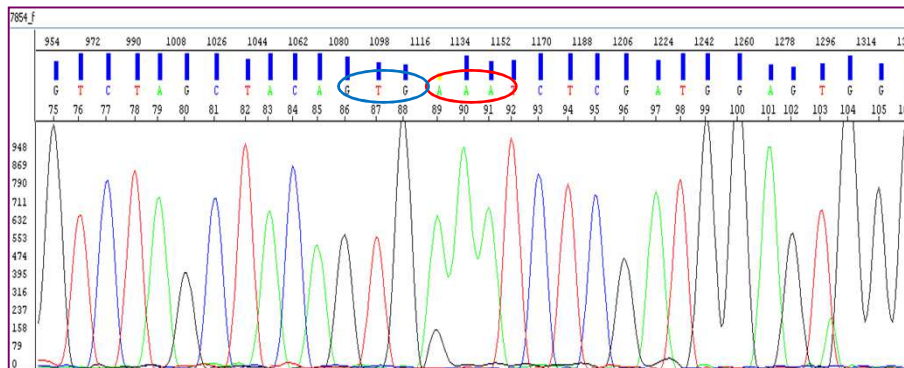


Wildtype per V600E



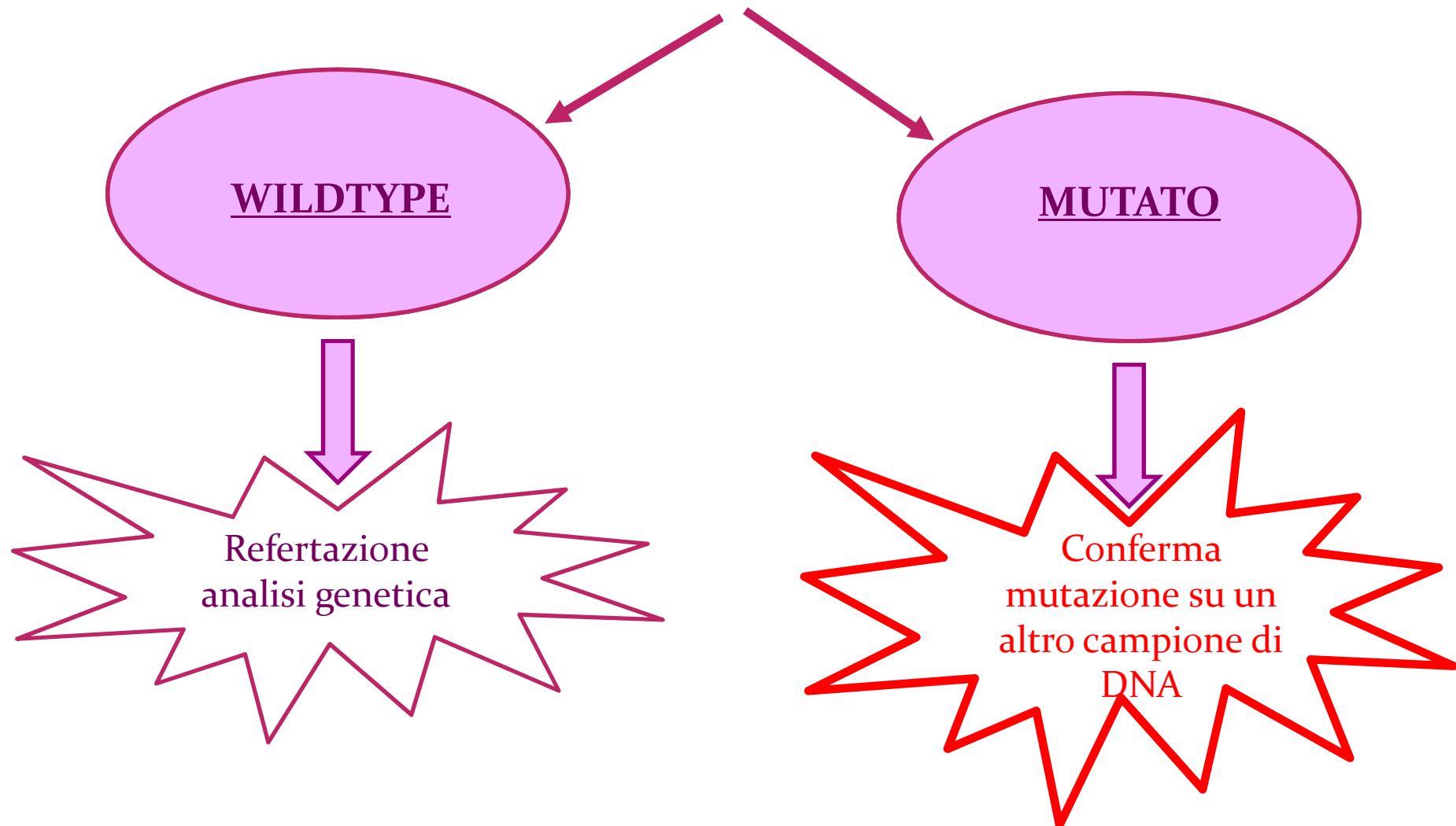
Mutazione V600E: GTG>GAG (Val600Glu)

8. LETTURA E INTERPRETAZIONE DEGLI ELETTROEFOGRAMMI



Mutazione K601E: AAA>GAA (Lys601Glu)

Qual'è il *destino del campione* al termine dell'analisi
in sequenziamento diretto?





Discriminazione allelica

La discriminazione allelica è una tecnica di analisi utilizzata in biologia molecolare nella diagnostica di laboratorio per determinare la presenza o l'assenza di una specifica mutazione puntiforme. Mediante questa metodica è possibile discriminare il genotipo del campione.

Workflow di un'analisi in discriminazione allelica:

1. estrazione del DNA da agoaspirato tiroideo;
2. amplificazione del DNA mediante Real-Time PCR;
3. analisi dei risultati.

1. **ESTRAZIONE DEL DNA DA AGOASPIRATO TIROIDEO**

L'estrazione del DNA da agoaspirato tiroideo può essere eseguita:

- con il kit *QIAamp DNA Investigator Kit*, mediante procedura manuale o automatizzata, utilizzando lo strumento *QIAcube*;
- con il kit ***DNA Extract All Reagents*** mediante procedura manuale.

Il kit ***DNA Extract All Reagents***:

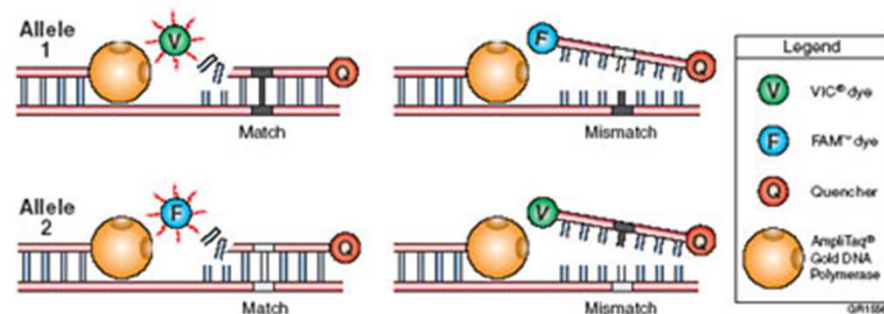
- costituito da 2 reagenti, *Lysis Solution* e *DNA Stabilizing Solution*;
- estrazione rapida di *n* campioni contemporaneamente;
- volumi ridotti di campione biologico;
- ottimizzato per applicazioni in Real-Time PCR.



Procedura:

- il campione di agoaspirato tiroideo, conservato a -20°C, viene scongelato;
- per ogni campione si prepara una provetta da 1,5 ml e la si numera;
- vengono prelevati 20 µl di agoaspirato tiroideo;
- si aggiungono 20 µl di Lysis Solution;
- incubazione 3' a RT;
- si aggiungono 20 µl di Stabilizing Solution.

2. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante Real-Time PCR



➤ la PCR viene eseguita in un volume finale di 20 µl, costituiti da 15 µl di mix e 5 µl di template;

	x 1 campione		SONDE	SEQUENZA	LUNGHEZZA
2X TAQMAN Master Mix	10 µl		BRAF MUTATION PROBE	5'-FAM-TAG CTA CAG AGA AAT C 3'	16
40X Braf Assay	0,5 µl		BRAF WILD PROBE	5'-VIC-CTA GCT ACA GTG AAA TC 3'	17
H ₂ O	4,5 µl				
Volume totale mix	15 µl				
DNA	PRIMERS	SEQUENZA	LUNGHEZZA	AMPLICONE paia di basi	ESONE
	BRAFexon15real_for	5' CTA CTG TTT TCC TTT ACT TAC TAC ACC TCA GA 3'	32	136	15

2. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante Real-Time PCR

Best practice per l'allestimento di una reazione di Real-Time PCR:

- insieme ai campioni da analizzare, vengono eseguiti:
 - 4 omozigoti wt ctl e 4 omozigoti mt;
 - 2 etero ctl;
 - 5 ntc;
- utilizzo di una cappa biologica per l'allestimento in sterilità;
- utilizzare tutte le precauzioni finalizzate ad evitare la contaminazione dei campioni:
 - puntali con filtro, plasticheria e H₂O DNA, RNA, DNAsi ed RNAsi free;
 - utilizzare guanti puliti, cambiandoli più volte;
- il DNA, i reagenti e la miscela di reazione devono essere “vortexati” e “spinnati” per renderli omogenei;
- il saggio, contenente i primers e le sonde, deve essere conservato a -20°C e al buio, per proteggere i fluorocromi dalla degradazione.



3. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante Real-Time PCR

Procedura per l'allestimento di una reazione di Real-Time PCR:

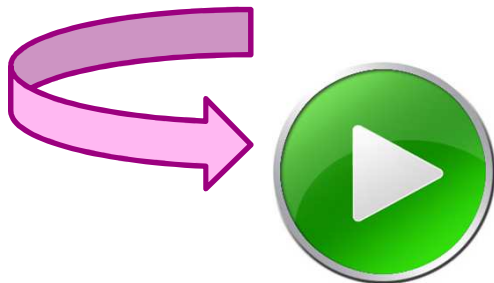
- sotto cappa, si preparano e si numerano provette da 0,2 ml per ogni campione, per i controlli positivi e negativi e una provetta da 2 ml per la mix;
- si prepara la mix, aggiungendo l'H₂O, il saggio e la master mix, si “vortexa” e si “spinna” per omogenizzarla e si dispensa nei campioni, nei controlli e solo in ultimo negli NTC;
- si aggiunge il DNA nei campioni e gli standard nei rispettivi controlli positivi;
- trasferimento dei volumi di reazione in una piastra da 96 well, che viene sigillata con un film trasparente e vortexata per eliminare eventuali bolle d'aria;

[illegible]

2. AMPLIFICAZIONE del DNA mediante Real-Time PCR

Procedura per l'allestimento di una reazione di Real-Time PCR:

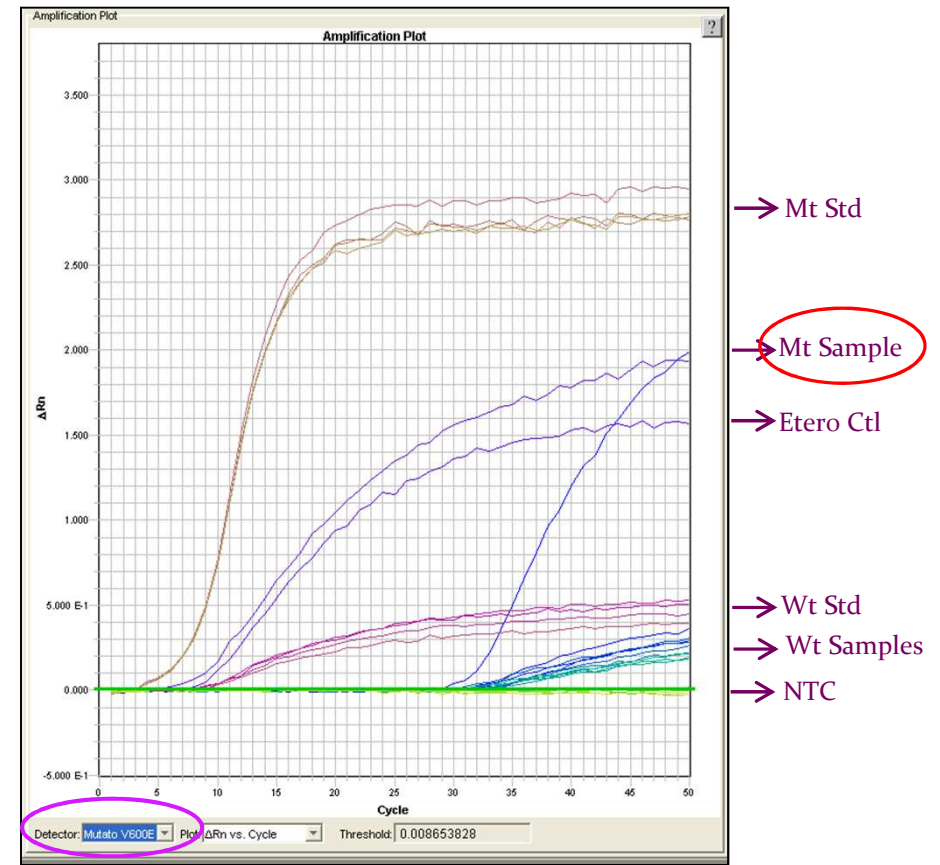
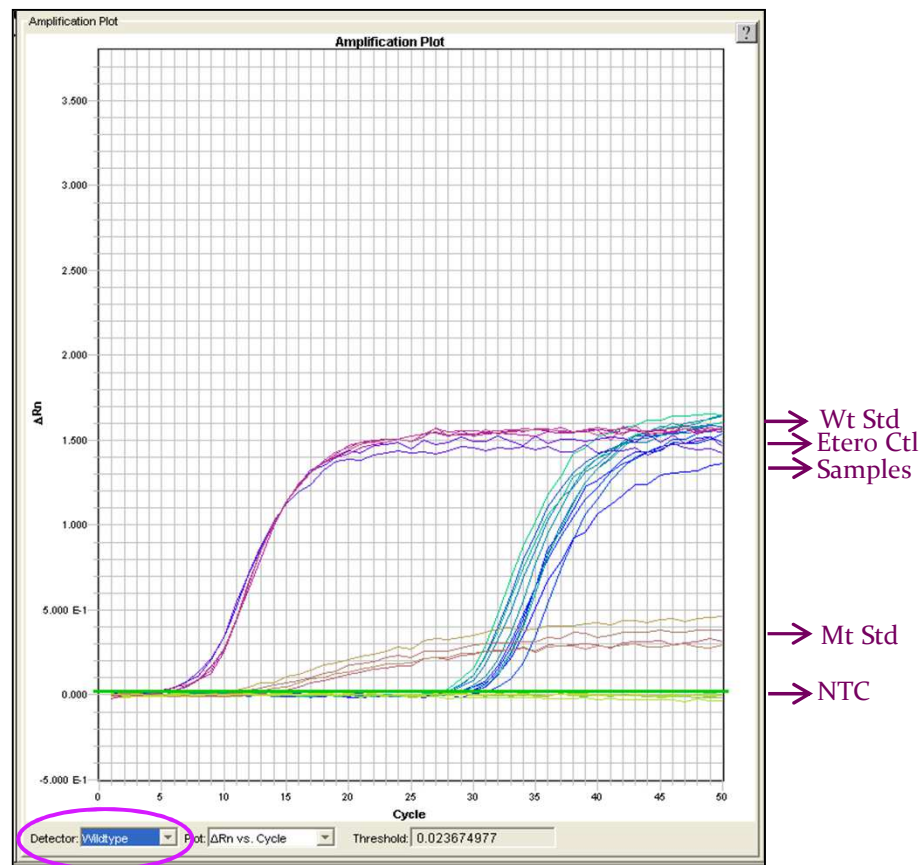
- caricamento della piastra per l'analisi sullo strumento AB7900HT Fast Real-Time PCR System, il quale è gestito da un software;
- compilazione di due piastre virtuali:
 - Piastra di pre e post-read;
 - Piastra di amplificazione.



Analisi di 96 campioni in 60' ca

3. ANALISI DEI RISULTATI

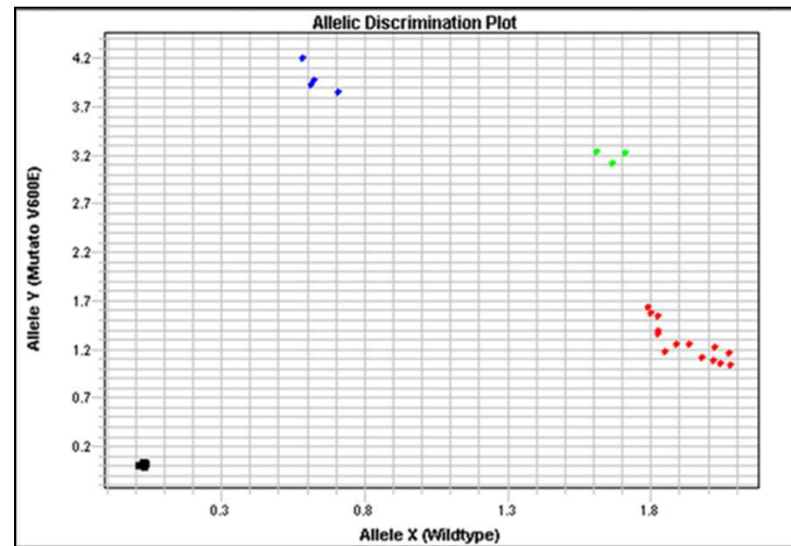
Visualizzazione dei *plot di amplificazione* per la sonda *Wildtype* e per la sonda *Mutata* ...



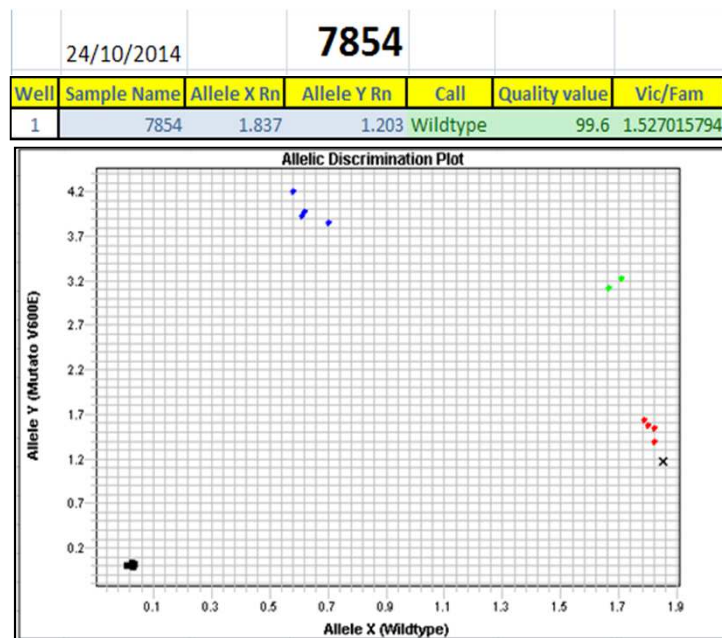
3. ANALISI DEI RISULTATI

... e del *plot della discriminazione allelica*.

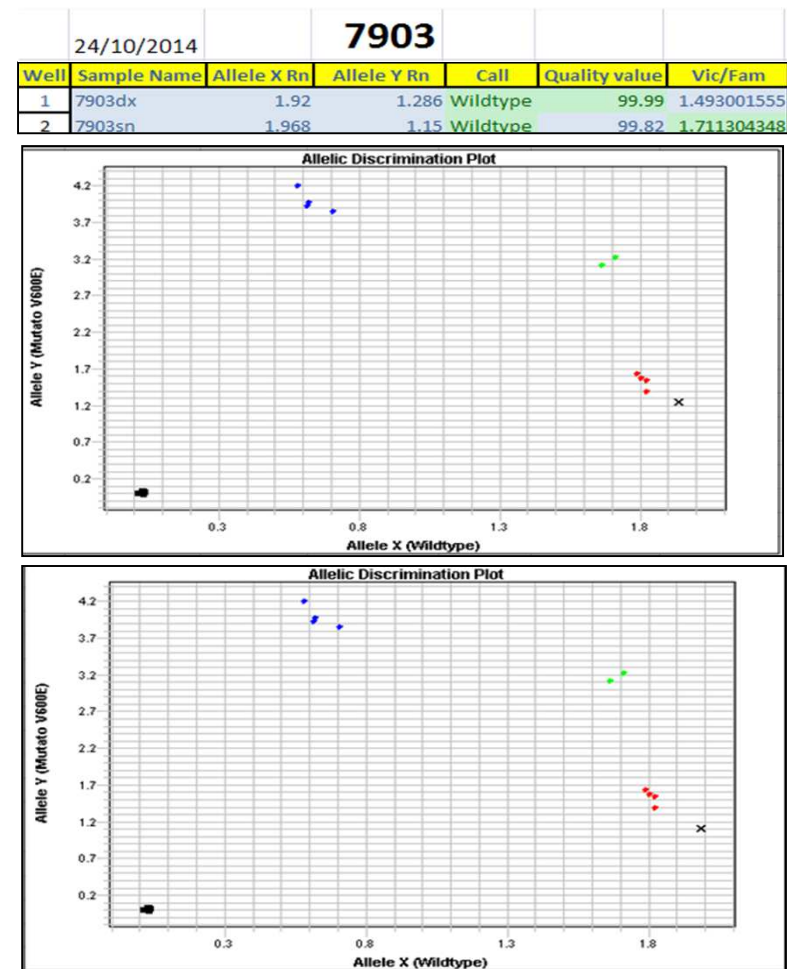
W	Sample Name	Allele X	Allele Y	C	Quality Value	Vic/Fd
1	7853	1.601	3.267	Both	99.93	0.490052
2	7844	1.815	1.386	Wildtype	99.62	1.3095238
3	7854	1.837	1.203	Wildtype	99.6	1.5270158
4	7846sn	1.877	1.288	Wildtype	99.92	1.4572981
5	7903dx	1.92	1.286	Wildtype	99.99	1.4930016
6	7868	2.01	1.261	Wildtype	99.67	1.593973
7	7903sn	1.968	1.15	Wildtype	99.82	1.7113043
8	7847	2.008	1.118	Wildtype	99.61	1.7960644
9	7905dx	2.031	1.093	Wildtype	99.43	1.8581885
10	7846dx	2.068	1.076	Wildtype	99.08	1.9219331
11	7905sn	2.064	1.199	Wildtype	99.18	1.7214345
37 +		1.699	3.259	Both	99.81	0.5213256
38 +		1.654	3.144	Both	99.99	0.5260814



3. ANALISI DEI RISULTATI



Campione wildtype

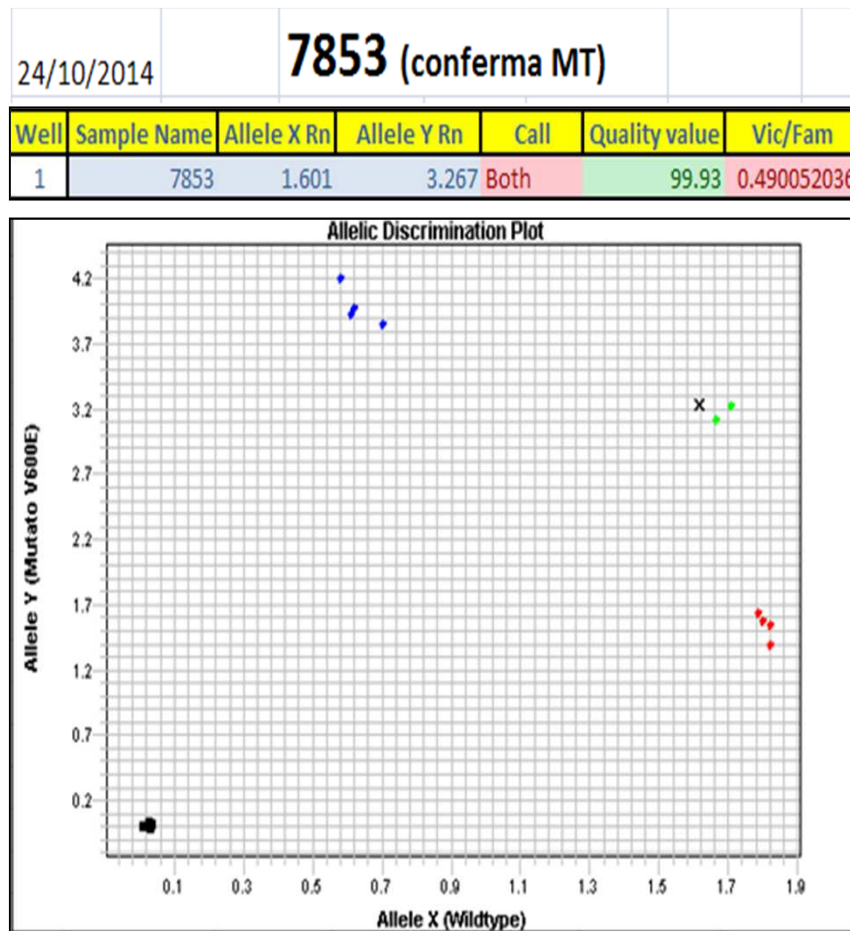


Campioni wildtype

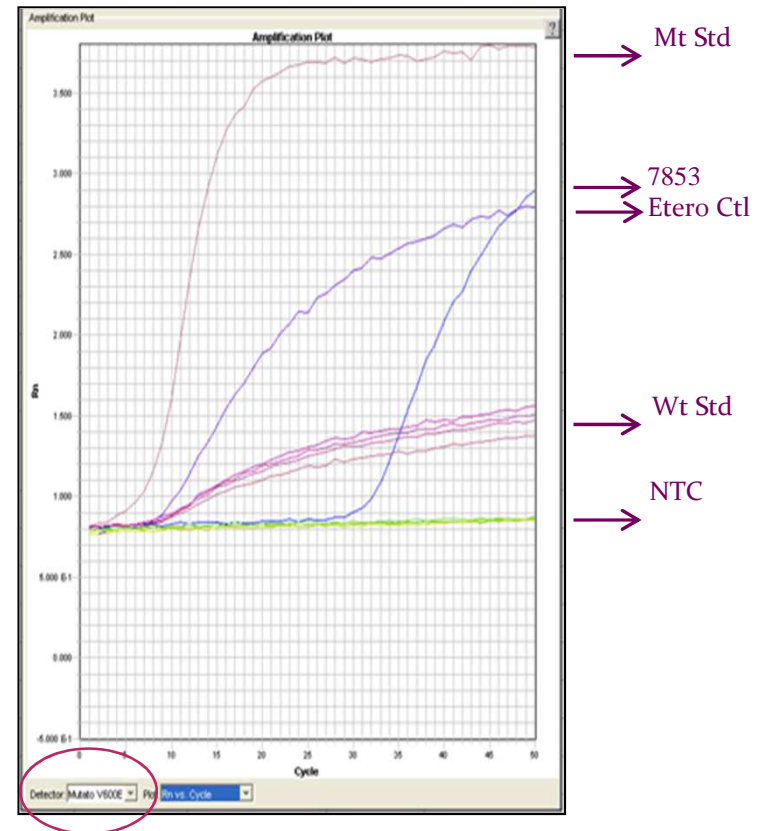
1

2

3. ANALISI DEI RISULTATI



Campione mutato V600E



SEQUENZIAMENTO DIRETTO vs DISCRIMINAZIONE ALLELICA

- Workflow lungo (ca 2 giorni)



- Workflow breve (ca 4 ore)

- individuazione di mutazioni nelle regioni fiancheggianti



- individuazione di una specifica mutazione

- metodica meno sensibile

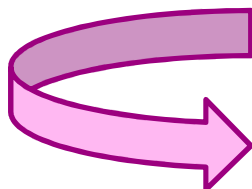


- metodica più sensibile

- metodica più costosa



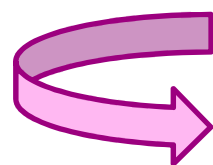
- metodica meno costosa



*Entrambe le metodiche sono validate
per l'utilizzo in diagnostica*



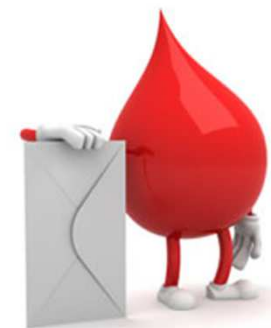
Al termine dell'esecuzione dell'analisi genetica



REFERTAZIONE



- *compilazione* del referto di analisi genetica su SAP, mediante format pre-compilati;
- *presa visione* del risultato dell'analisi genetica da parte del medico responsabile;
- *stampa* ed *archiviazione* del referto firmato dal medico responsabile;
- *consegna* (o invio al domicilio) del referto al paziente.



Format referto analisi genetica di BRAF

OGGETTO: Esito dell'analisi genetica del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome per la ricerca di mutazioni somatiche nel gene B-RAF eseguita presso il Laboratorio dell'UO di Endocrinologia.

Il/La Sig./Sig.ra Cognome Nome ha eseguito presso il nostro ambulatorio un agoaspirato tiroideo ecoguidato di una nodularità presente a carico del lobo sinistro/destro/istmo della tiroide.

Sul/i campione/i del citoaspirato prelevato/i dal/i nodulo/i tiroideo/i è stata eseguita l'analisi genetica mirata alla ricerca della mutazione somatica a carico dell'esone 15 del gene B-RAF (Val600), coinvolta nello sviluppo del carcinoma papillare della tiroide.

L'analisi molecolare è stata eseguita mediante estrazione del DNA somatico

e successiva amplificazione per Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction) con sonde fluorescenti e primers specifici per l'esone 15 al fine di ottenere una discriminazione allelica.

e successiva amplificazione per PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers intronici dell'esone 15, seguita poi da sequenziamento del DNA dell'esone 15.

Risultati:

L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome, nelle condizioni sopra descritte, non ha identificato alcuna mutazione nella regione analizzata del gene B-RAF.

oppure

L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome, nelle condizioni sopra descritte, ha identificato la mutazione somatica puntiforme in eterozigosi nell'esone 15 del gene B-RAF, responsabile di una sostituzione del residuo valina in posizione 600 con un residuo di glutammato:

Val600Glu, GTG>GAG

Refertato il XX/XX/XXXX

Format referto analisi genetica di RAS

OGGETTO: Esito dell'analisi genetica *del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome* per la ricerca di mutazioni somatiche nel gene RAS eseguita presso il Laboratorio dell'UO di Endocrinologia.

Il/La Sig./Sig.ra Cognome Nome ha eseguito presso il nostro ambulatorio un agoaspirato tiroideo ecoguidato di una nodularità presente a carico del lobo *sinistro/destro/istmo* della tiroide.

Sul/i campione/i del citoaspirato prelevato/i dal/i nodulo/i tiroideo/i è stata eseguita l'analisi genetica mirata alla ricerca delle mutazioni somatiche a carico dell' esone 1 (codone 12 e 13) e dell'esone 2 (codone 61) dei geni H-RAS, N-RAS e K-RAS, possibilmente coinvolte nello sviluppo del carcinoma papillare e follicolare della tiroide.

L'analisi molecolare è stata eseguita mediante estrazione del DNA somatico, amplificazione per Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction) e successiva denaturazione in alta risoluzione degli ampliconi (HRM, High Resolution Melting).

Risultati:

L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome, nelle condizioni sopra descritte, non ha identificato alcuna mutazione nelle regioni analizzate dei geni H-RAS, N-RAS e K-RAS.

oppure

L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico del/della Sig./Sig.ra Cognome Nome, nelle condizioni sopra descritte, ha identificato la presenza di una mutazione somatica in eterozigosi a carico dell'esone 2 (codone 61) del gene N-RAS, successivamente identificata mediante sequenziamento diretto come segue:

CAA>CGA (Gln>Arg)

Refertato il XXXX/XXXX

Referto definitivo analisi genetica di BRAF

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Ferrara

università di ferrara
BA GIOVANNI ANTONIO GAZZARDI SPINATI

Arcispedale S. Anna
DIP. MEDICO SPECIALISTICO
UO ENDOCRINOLOGIA

**EN-18 (1941) AMB. ENDOCRINOLOGICO TEST MOLECOLARI-
CONA**

3014237199
REFERTO
09.10.2014
DATA ACCETTAZIONE

A0222987
CODICE D.O.
D.H.ENDOCRINOLOGIA
PROVENIENZA

DATI ANAGRAFICI DEL PAZIENTE

NOME E COGNOME _____ **M**
SESSO

INDOSSO E DATA DI NASCITA _____ **CODICE FISCALE** _____

INDIRIZZO _____ **TELEFONO** _____

PRESTAZIONI EROGATE
ANAL. MUTAZIONE DNA (K-RAS) (IBRID, NON RADIOMARCA)
ESTR. DNA O RNA DA SANG. PER-TESS-COLT. CELL-VILLI C-

REFERTO
OGGETTO: Esito dell'analisi genetica del Sig. _____ per la ricerca di mutazioni somatiche nel gene B-RAF eseguita presso Il Laboratorio dell'UO di Endocrinologia.

Il Sig. _____ ha eseguito presso il nostro ambulatorio un agoaspirato tiroideo ecoguidato di una nodularità presente a carico del lobo destro della tiroide. Sul campione del citospinso prelevato dal nodulo tiroideo è stata eseguita l'analisi genetica mirata alla ricerca della mutazione somatica a carico dell'esone 15 del gene B-RAF (Val600), coinvolta nello sviluppo del carcinoma papillare della tiroide. L'analisi molecolare è stata eseguita mediante estrazione del DNA somatico e successiva amplificazione per Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction) con sonde fluorescenti e primers specifici per l'esone 15 al fine di ottenere una discriminazione allelica.

Risultati:
L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico del Sig. _____, nelle condizioni sopra descritte, non ha identificato alcuna mutazione nella regione analizzata del gene B-RAF.

Refertato il 20/10/2014

Il Medico
MARIA CHIARA ZATELLI

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Ferrara

università di ferrara
BA GIOVANNI ANTONIO GAZZARDI SPINATI

Arcispedale S. Anna
DIP. MEDICO SPECIALISTICO
UO ENDOCRINOLOGIA

**EN-18 (1941) AMB. ENDOCRINOLOGICO TEST MOLECOLARI-
CONA**

3014220133
REFERTO
30.09.2014
DATA ACCETTAZIONE

A0222987
CODICE D.O.
PAZIENTE ESTERNO
PROVENIENZA

DATI ANAGRAFICI DEL PAZIENTE

LAURA VESPA **F**
NOME E COGNOME **SESSO**

INDOSSO E DATA DI NASCITA _____ **CODICE FISCALE** _____

INDIRIZZO _____ **TELEFONO** _____

PRESTAZIONI EROGATE
ANAL. SEQUENZIAZIONE DNA MED. SEQUENZIAIMENTO
ANALISI MUTAZIONE DNA CON PCR E ELETTROFORESI
ANALISI MUTAZIONE DNA CON PCR E ELETTROFORESI
ANALISI MUTAZIONE DNA CON PCR E ELETTROFORESI
ESTR. DNA O RNA DA SANG. PER-TESS-COLT. CELL-VILLI C-

REFERTO
OGGETTO: Esito dell'analisi genetica della Sig.ra _____ per la ricerca di mutazioni somatiche nel gene B-RAF eseguita presso Il Laboratorio dell'UO di Endocrinologia.

La Sig.ra _____ ha eseguito presso il nostro ambulatorio un agoaspirato tiroideo ecoguidato di una nodularità presente a carico del lobo destro della tiroide. Sul campione del citospinso prelevato dal nodulo tiroideo è stata eseguita l'analisi genetica mirata alla ricerca della mutazione somatica a carico dell'esone 15 del gene B-RAF (Val600), coinvolta nello sviluppo del carcinoma papillare della tiroide. L'analisi molecolare è stata eseguita mediante estrazione del DNA somatico e successiva amplificazione per PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers intronici dell'esone 15, seguita poi da sequenziamento del DNA dell'esone 15.

Risultati:
L'analisi genetica eseguita sul DNA somatico della Sig.ra _____, nelle condizioni sopra descritte, ha identificato la mutazione somatica puntiforme in eterozigosi nell'esone 15 del gene B-RAF, responsabile di una sostituzione del residuo valina in posizione 600 con un residuo di glutammato:

Val600Glu, GTG>GAG

Refertato il 28/10/2014

Il Medico
MARIA CHIARA ZATELLI

Durante l'iter diagnostico, il campione biologico attraversa step cruciali che portano alla produzione di un referto finale definitivo.
Durante le diverse fasi di processazione è importante:



- *tracciabilità* del campione biologico;
- porre *meticola* attenzione a ciò che si sta facendo;
- non farsi *MAI alienare* dalla routine quotidiana;



“... il campione che hai di fronte potrebbe essere quello di un tuo familiare...”



Grazie per l'attenzione