



# Corso propedeutico all'esame di stato di abilitazione alla professione di biologo 2021

Delegazione Regionale della Sicilia - Messina

10 novembre 2021

Anna Paola Capra



[annapaola.capra@unime.it](mailto:annapaola.capra@unime.it)



# **“Principali tecniche di biologia molecolare in diagnostica e nel centro di PMA”**

**9:00-10:45**

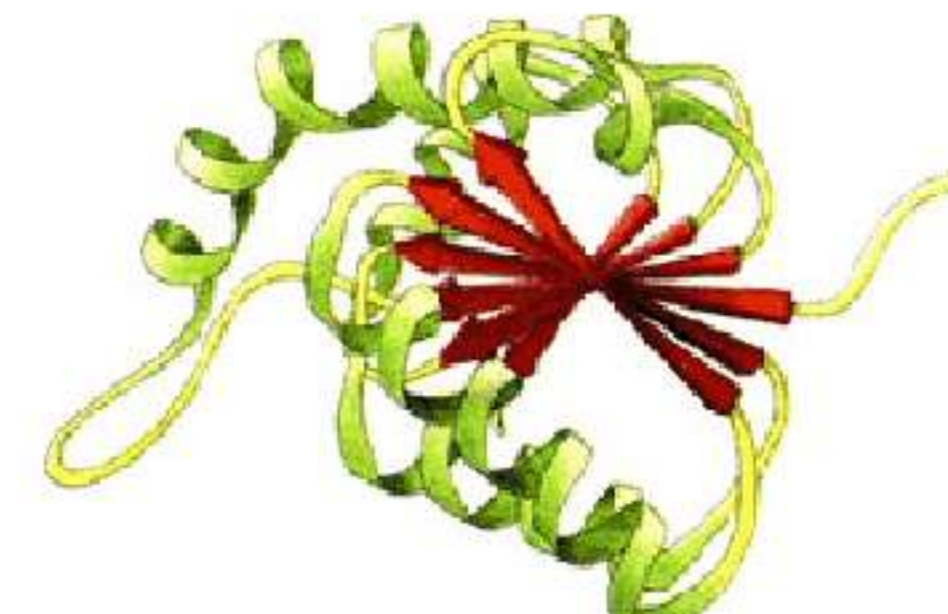
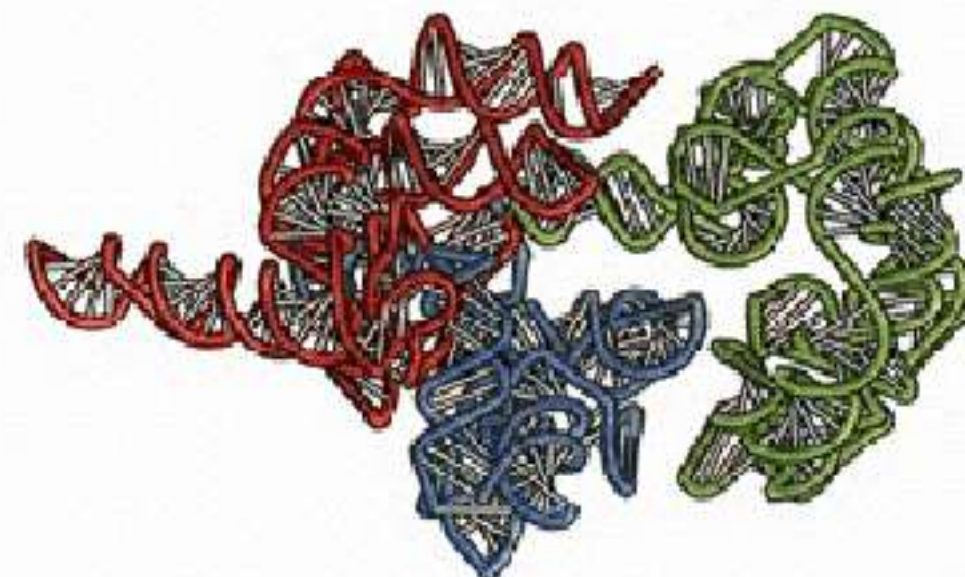
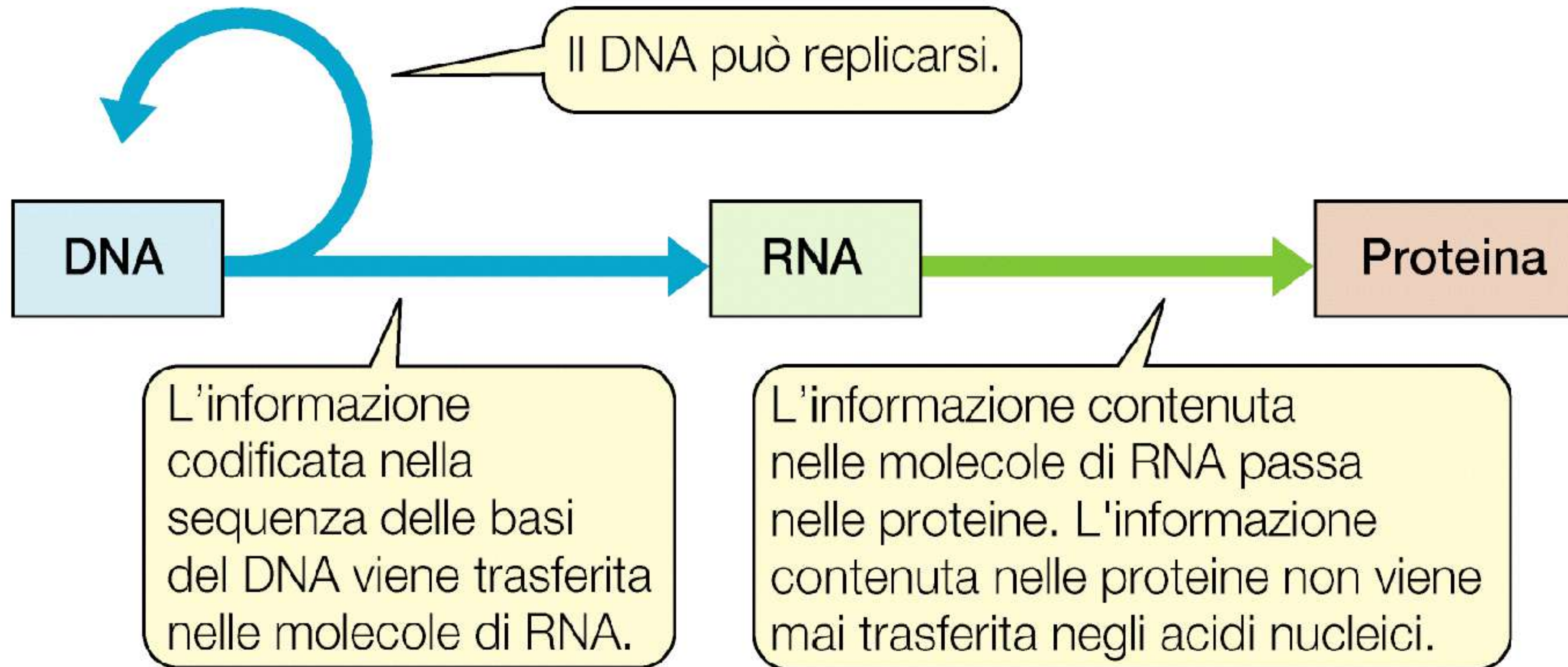
**“Analisi dei cromosomi e  
dei loro riarrangiamenti”**

**10:45-12:00**





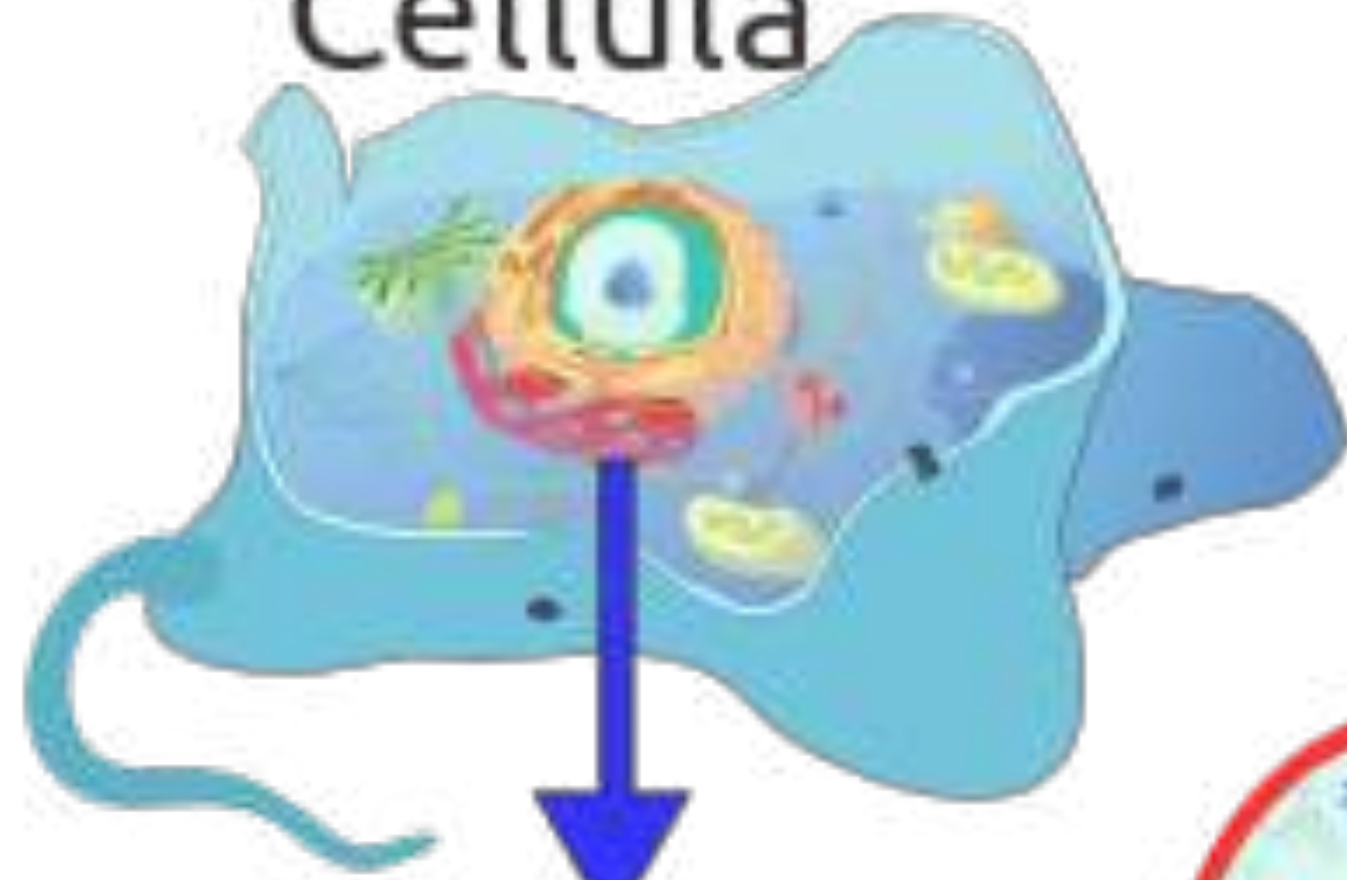
# Il Dogma Centrale della Biologia





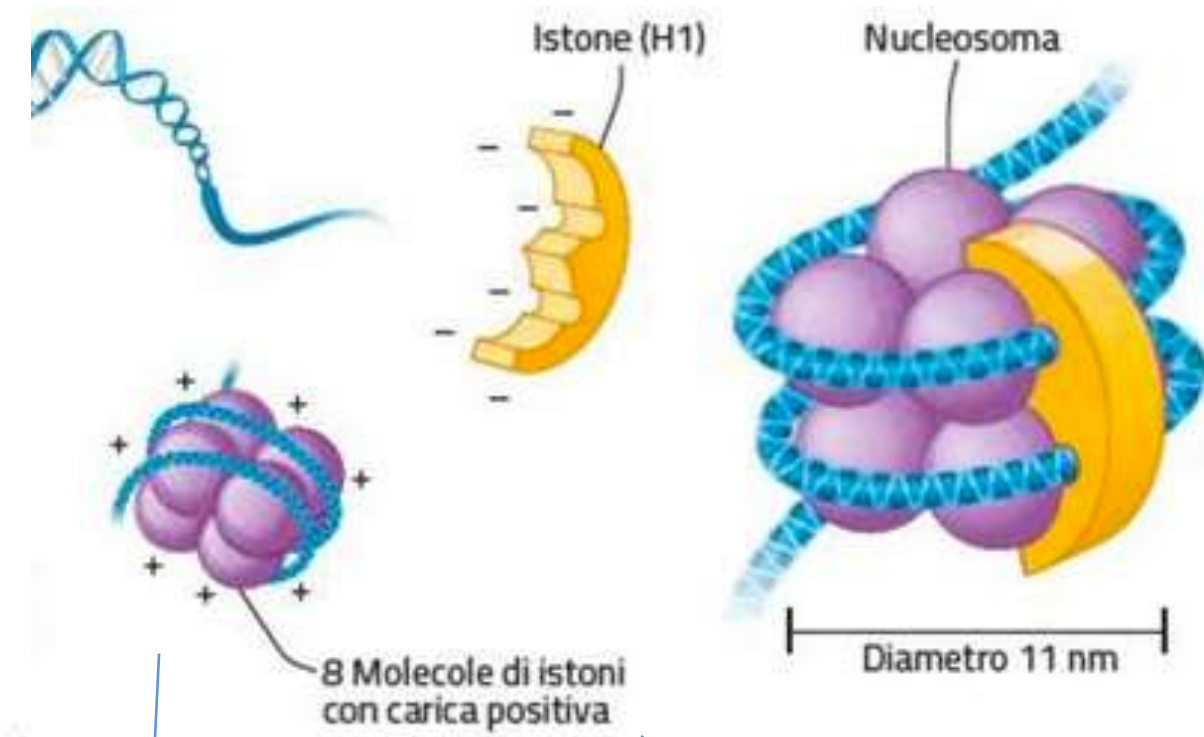
75-100 trilioni  
100  $\mu\text{m}$

Cellula



Nucleo

6-8  $\mu\text{m}$



Cromosoma

30 nm



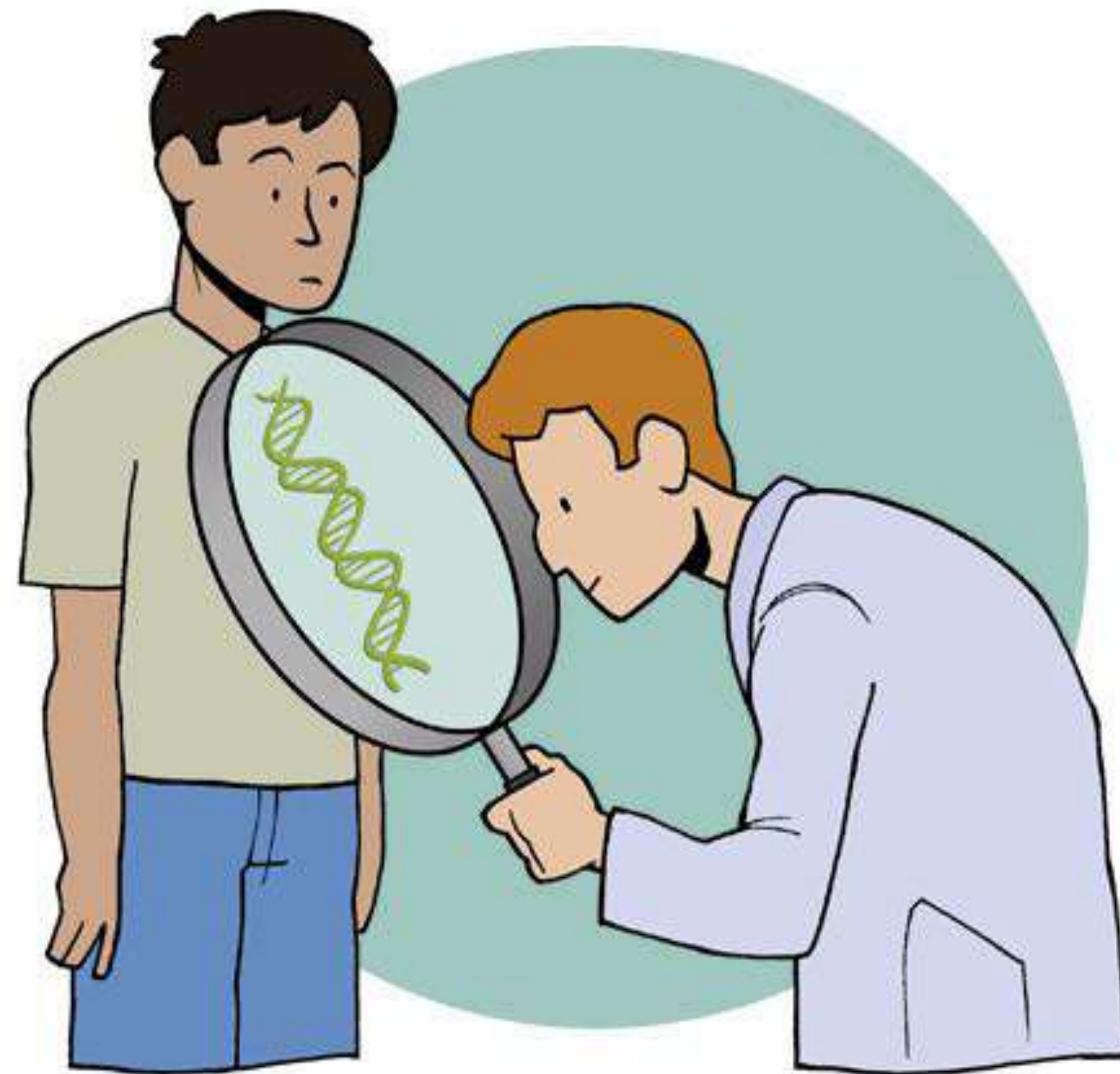
DNA

2 nm

-  = Adenina
-  = Timina
-  = Citosina
-  = Guanina
-  = Struttura laterale (gruppo fosfato e 2-deossiribosio)

1 m

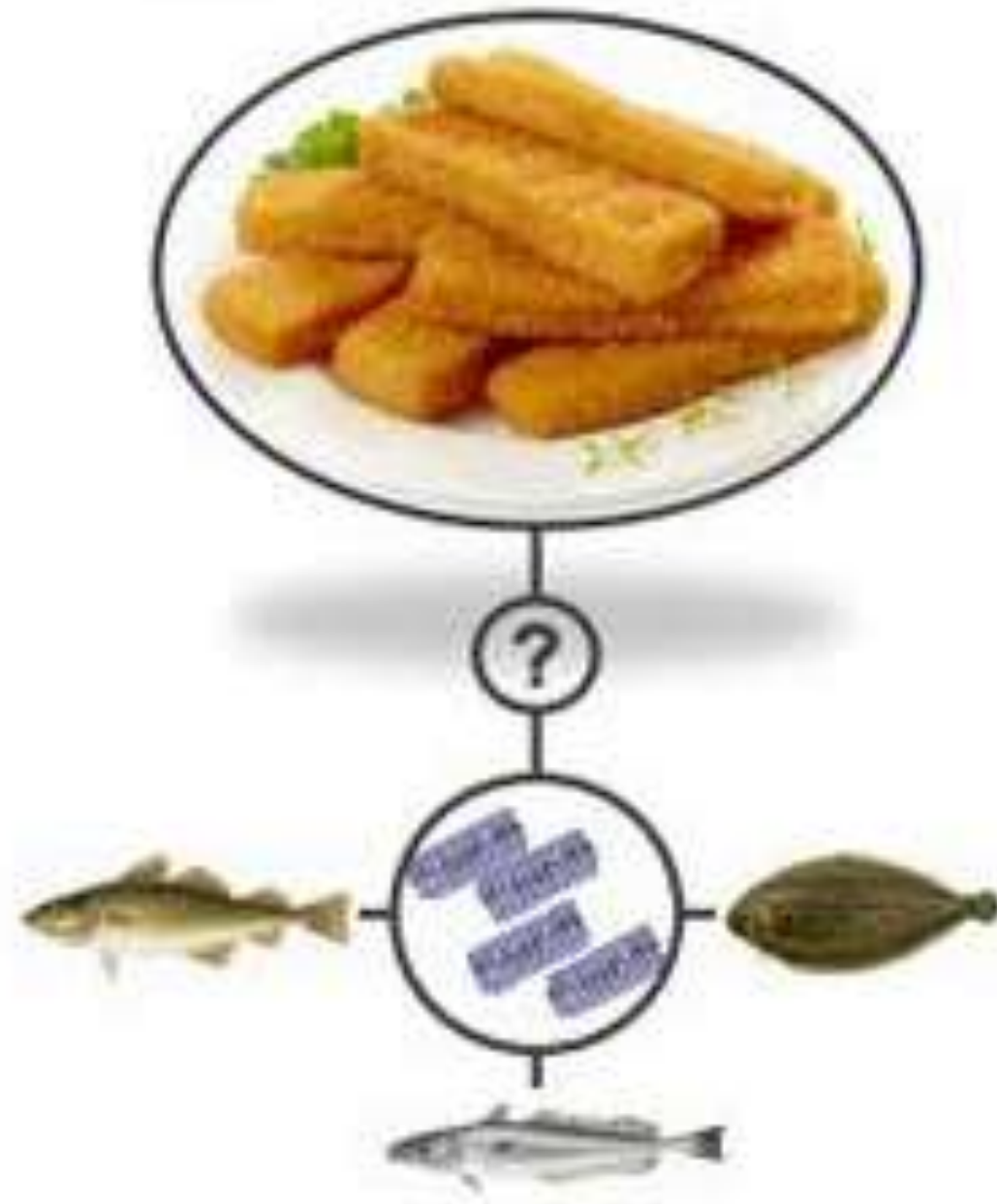
# Perché studiamo il DNA?





### Sicurezza e frode alimentare

Con quale pesce sono fatti questi bastoncini?



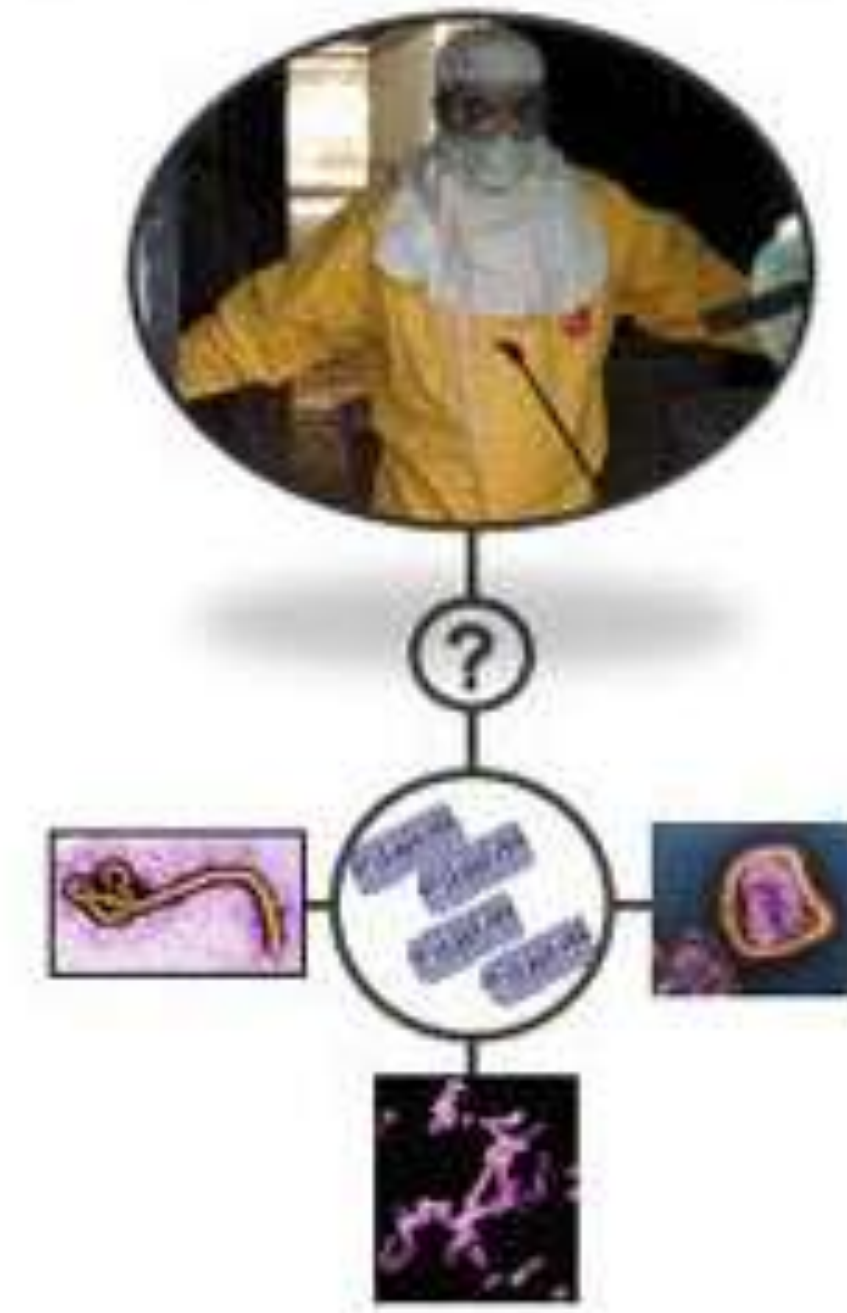
### Biodiversità

Quali specie vivono in questo ambiente?



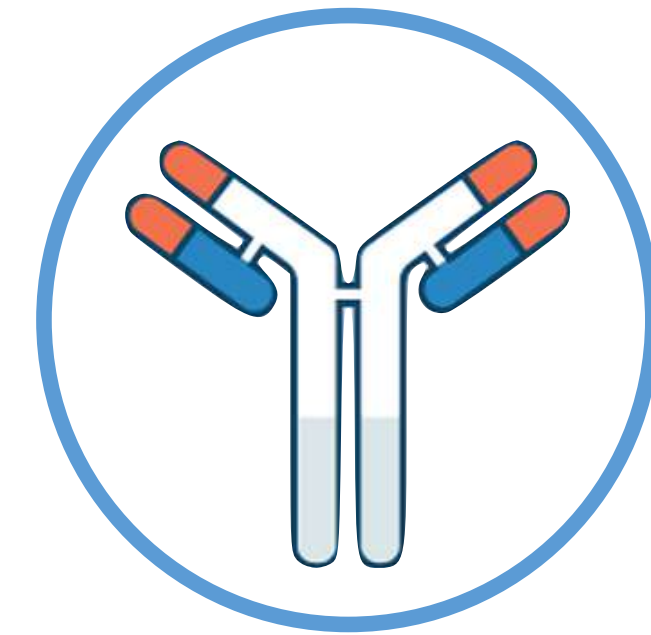
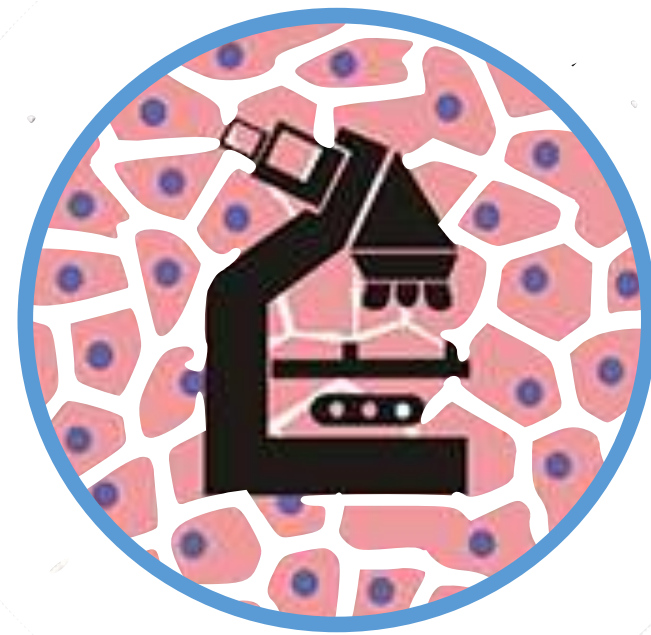
### Identificazione di patogeni

Quali batteri sono responsabili dell'emergenza sanitaria?



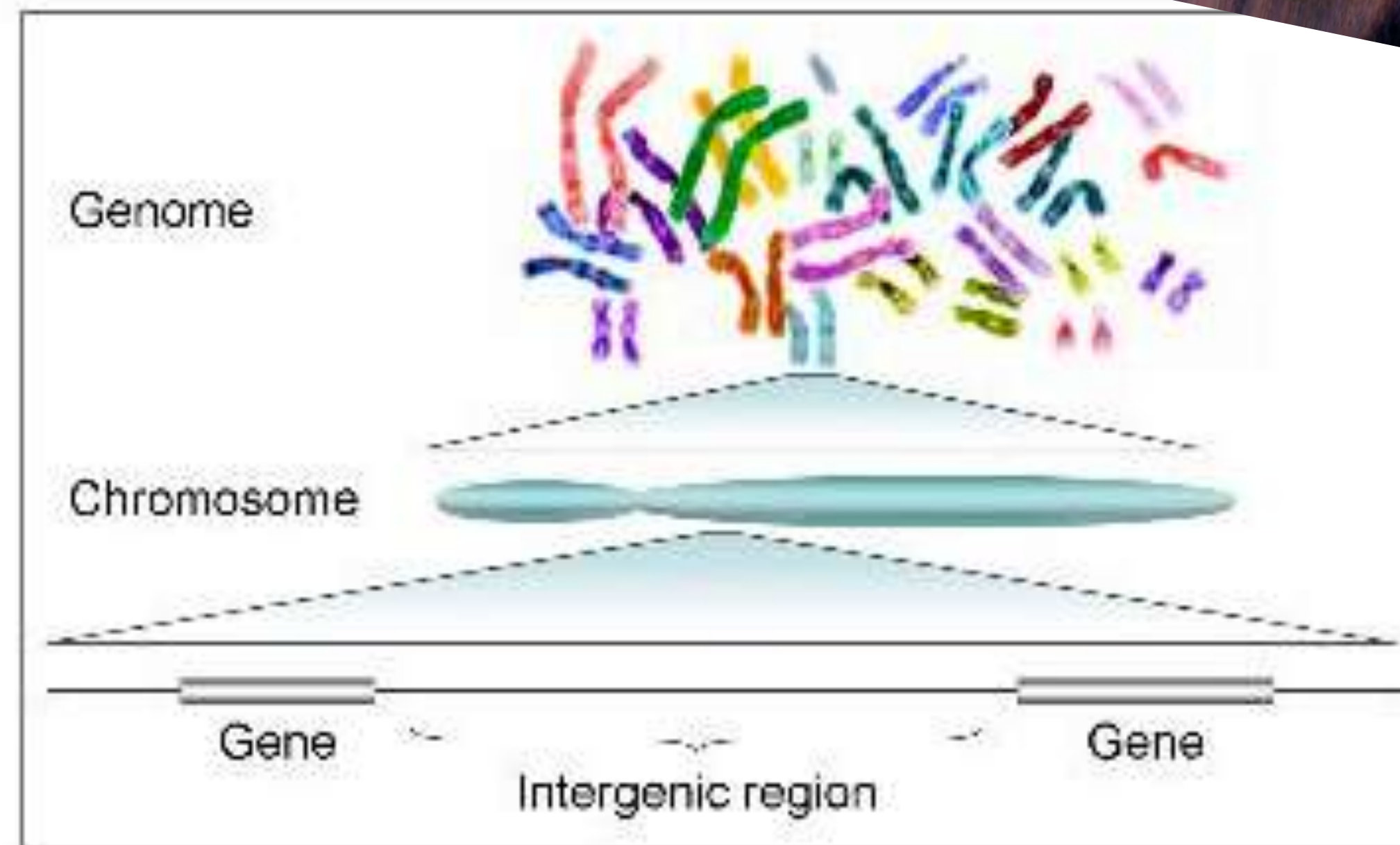
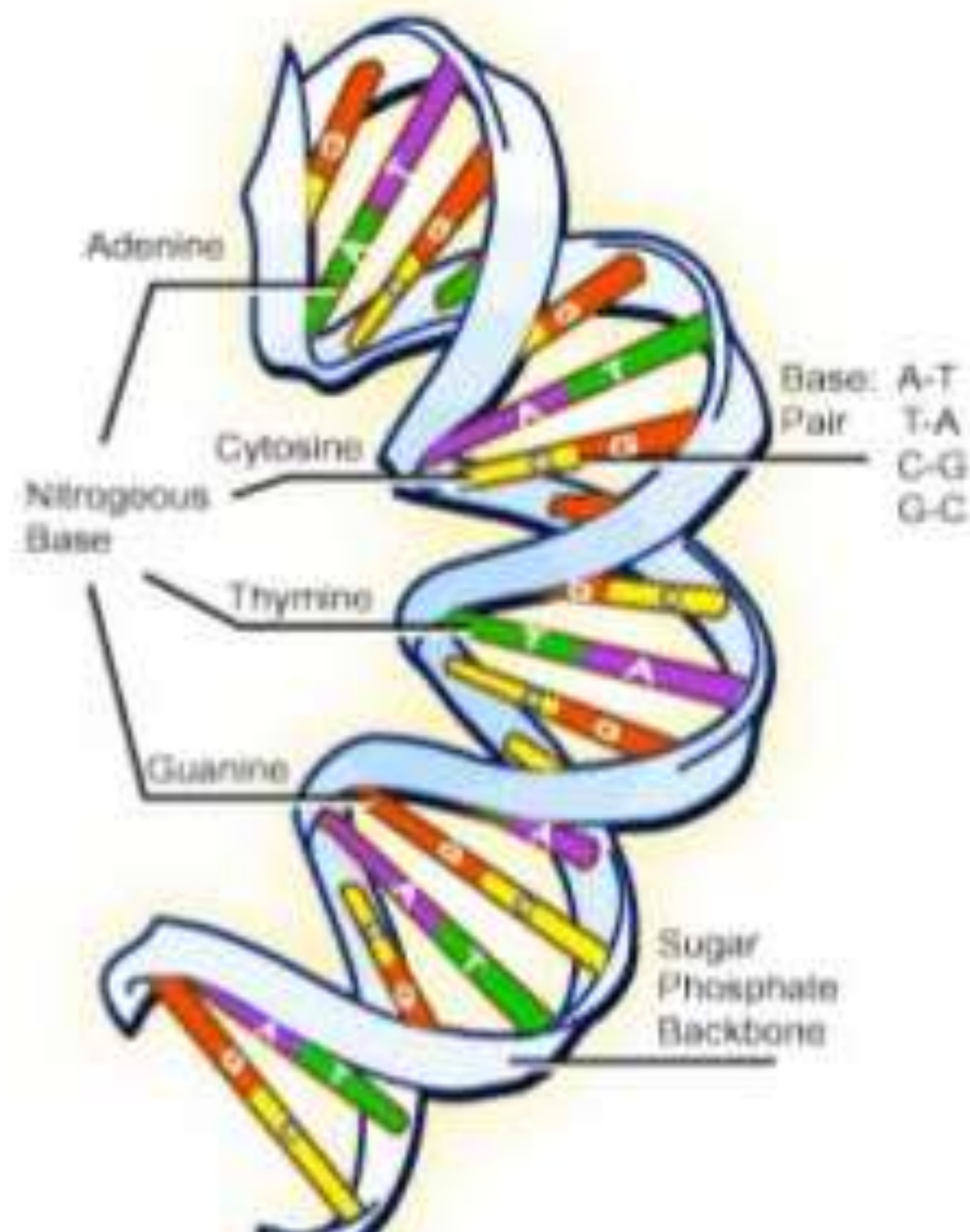


# I laboratori in ambito ospedaliero





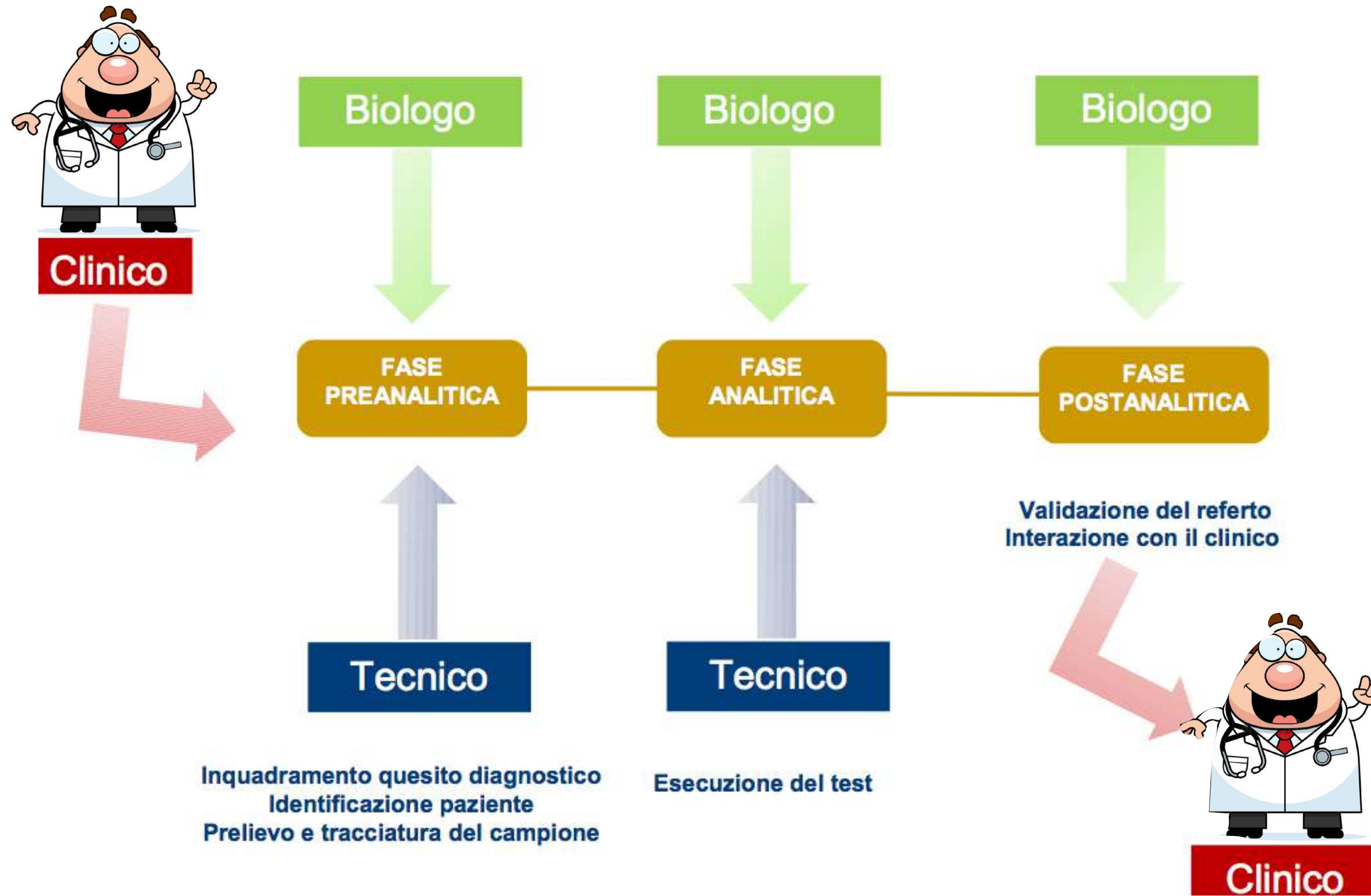
- 46 cromosomi distinti (22 coppie di autosomi + X + Y)
- ~3,2 miliardi di paia di basi A-T e G-C.
- ~20,000-25,000 geni.



**GENOTIPO / FENOTIPO**



# I confini e le competenze





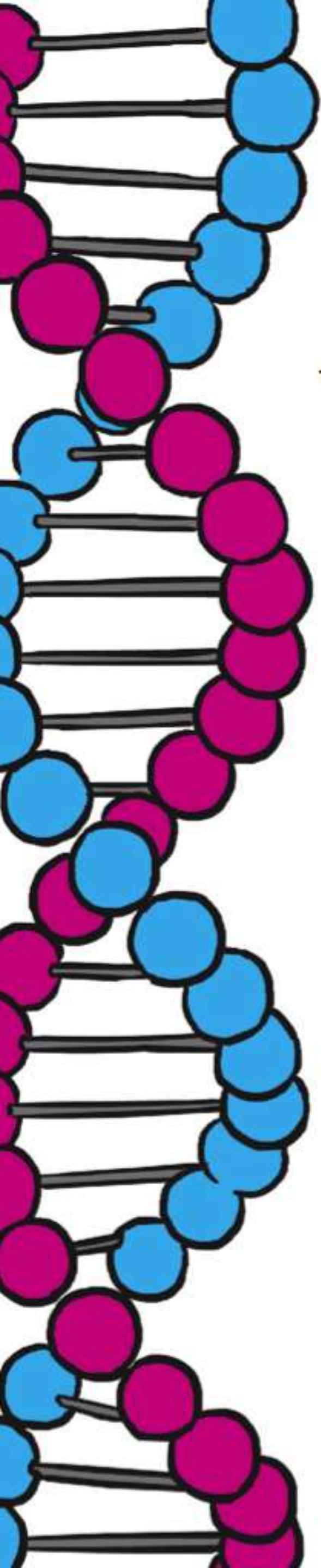
# Autonomia professionale e validazione del referto

- è autonomo nella lettura dei preparati e nella loro **refertazione**;
- si assume la **responsabilità** ultima dell'atto analitico e della risposta al quesito diagnostico;
- interagisce con il clinico per favorire l'**interpretazione dei risultati** e il loro corretto utilizzo nel processo diagnostico terapeutico.

Il referto “valido” è quello che evita gli errori e che descrive correttamente quanto misurato e gli assegna il **significato biologico e/o patologico**, rispondendo al quesito del clinico ed alle attese del **Paziente**.

Per offrire la più appropriata risposta ai quesiti diagnostici posti al laboratorio, il biologo deve operare all'interno di un'**equipe multidisciplinare** al fine garantire un servizio adeguato e che soddisfi le richieste del clinico e le aspettative del paziente.





# Il ruolo del biologo nel lab. di genetica

- **Strategia di approccio all'indagine a seconda delle finalità, del quesito diagnostico, della peculiarità del soggetto e delle caratteristiche di performance del test stesso.**
- **Presenza in carico del paziente all'interno del percorso del test diagnostico, dall'accettazione del campione biologico al referto, con scelte di eventuali esami integrativi, in sinergia e accordo con il clinico.**
- **Interpretazione del test e valore diagnostico e/o prognostico da condividere con il clinico e con il paziente (counseling pre e post test).**
- **Interpretazione e gestione del dato anche a lungo termine (banche dati).**



# L'ERRORE IN LABORATORIO

## Errori all'interno del laboratorio

Procedura non rispettata  
Accettazione non corretta

Scambio provette durante l'esecuzione dell'esame  
Informatizzazione

Errore nella refertazione  
Informatizzazione

## Errori causati da problemi esterni al laboratorio

Identificazione non corretta del paziente

Scambio di provette durante il prelievo

## Errori all'interfaccia laboratorio-clinico

Non appropriatezza nell'uso dell'esame

Non appropriatezza nell'interpretazione dell'esame





# Classificazione dei test genetici



## Test diagnostici

Consentono di stabilire una diagnosi o di confermare un sospetto clinico in un individuo già affetto. Possono essere effettuati durante il periodo prenatale o durante tutto l'arco di vita post-natale. Esempi sono: l'analisi citogenetica per individuare *anomalie cromosomiche*, la ricerca di mutazioni nel gene *CFTR* in neonati con infezioni polmonari ricorrenti e sospetta fibrosi cistica, l'identificazione di espansioni del gene *FRAXA* in pazienti con un quadro clinico di ritardo mentale.

## Test preclinici e presintomatici

Numerose malattie genetiche, soprattutto quelle di tipo *autosomico dominante*, possono non essere presenti alla nascita ma comparire successivamente. Se il gene responsabile è noto diventa possibile stabilire se un soggetto asintomatico abbia o meno ereditato l'allele mutato e, quindi, possa sviluppare in futuro la malattia ad esso associata. Il risultato del test genetico può consentire di ridurre la mortalità della malattia, qualora siano disponibili forme di prevenzione secondaria e adeguate terapie. Spesso, però, la disponibilità di un test genetico non si accompagna ad una migliore capacità di gestione clinica della malattia, anche se l'individuazione di soggetti a rischio può essere importante per applicare idonee strategie di prevenzione. (Distrofie Muscolari, SLA,...)



# Classificazione dei test genetici



## Test per la valutazione della suscettibilità genetica

Alcuni test consentono l'individuazione di genotipi che non sono direttamente causa di malattia, pur comportando un aumentato rischio di sviluppare una patologia, se associati a esposizione a fattori ambientali che la favoriscono. Sono esempi di queste condizioni il deficit di *glucosio-6-fosfato deidrogenasi*, che predispone a crisi di emolisi acuta in seguito all'assunzione di alcuni farmaci, o quello di *alfa-1-antitripsina* che, associato al fumo, predispone all'enfisema polmonare giovanile.

## Test per l'identificazione degli eterozigoti

Nel caso di malattie *autosomiche recessive*, come ad esempio la talassemia, è possibile identificare i portatori eterozigoti nella popolazione. Queste indagini, quando effettuate in maniera corretta e, soprattutto, quando associate ad una larga diffusione dell'informazione, hanno avuto il risultato di ridurre l'incidenza della patologia in esame.

## Indagini medico-legali

La presenza nel genoma umano di un numero straordinariamente elevato di regioni polimorfe, cioè individualmente variabili, e di marcatori utili a riconoscere queste regioni utilizzando tecniche relativamente semplici, consente sia l'*accertamento di paternità* che l'attribuzione di tracce biologiche a determinati individui con un grado di probabilità molto elevato.



# Classificazione dei test genetici



## Test di farmacogenetica

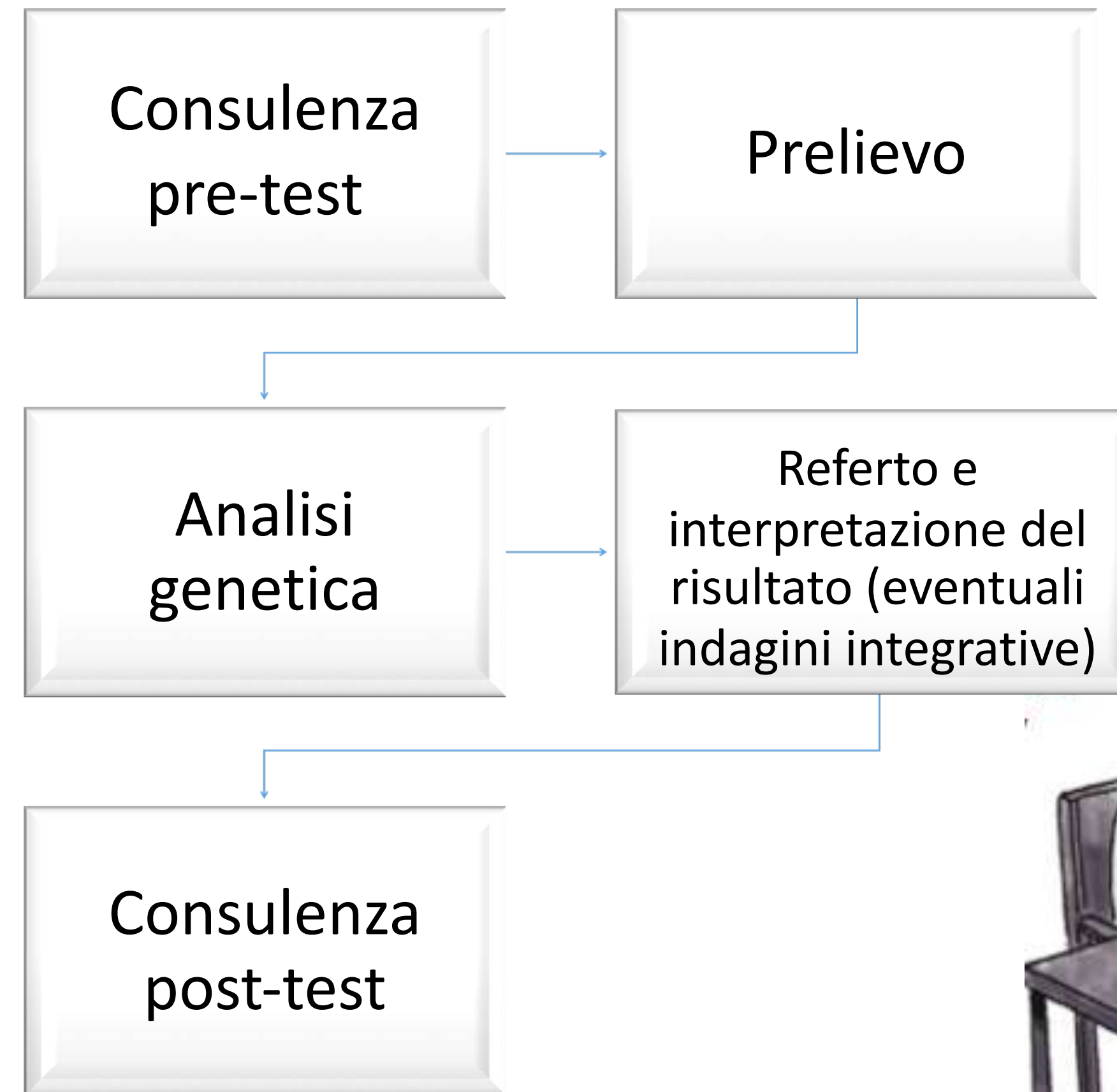
Riguardano le analisi finalizzate all'identificazione di variazioni di sequenza nel DNA in grado di predire la *risposta «individuale» ai farmaci*, in termini di efficacia e di rischio relativo di eventi avversi (*TPMT*, tiopurina S-metiltransferasi per il metabolismo dei farmaci tiopurinici).

## Test genetici finalizzati alla ricerca

Utilizzati per comprendere le basi biologiche di una malattia che per sviluppare nuovi test genetici. Sono soggetti alle norme di sperimentazione clinica compresa l'acquisizione del consenso informato. I nuovi test devono essere validati a livello analitico e clinico ed il protocollo esecutivo deve essere standardizzato.



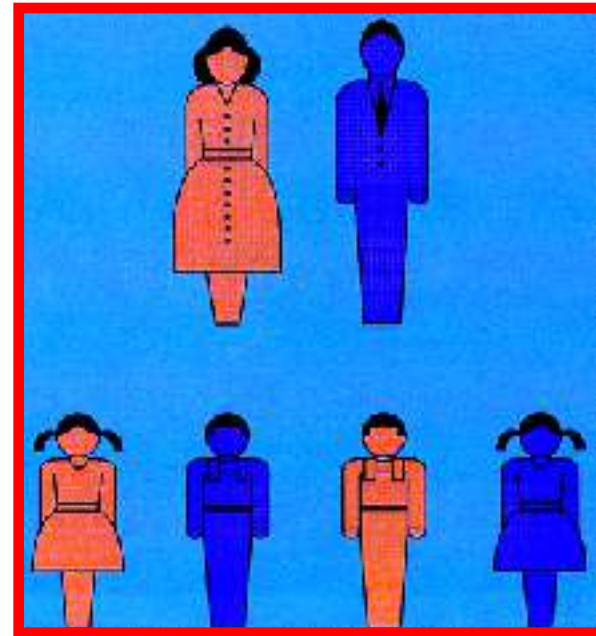
# IL PERCORSO DEI TEST GENETICI



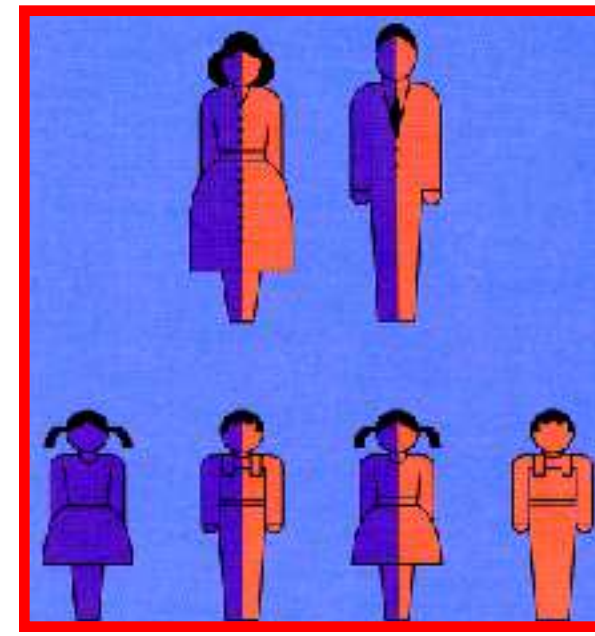


# Classificazione delle malattie ereditarie

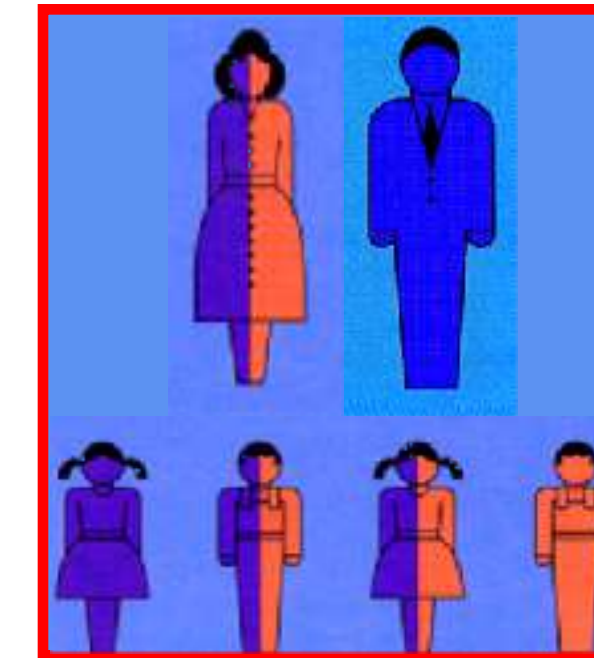
## Malattie monogeniche o mendeliane



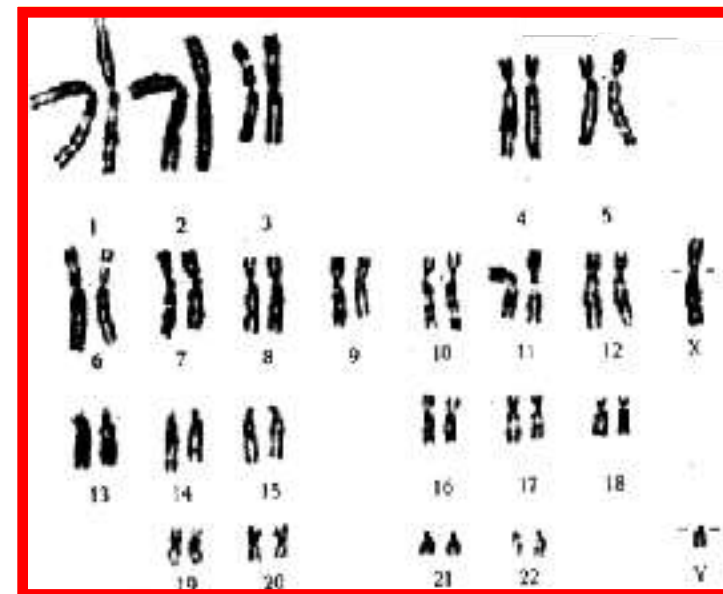
Autosomiche  
dominanti



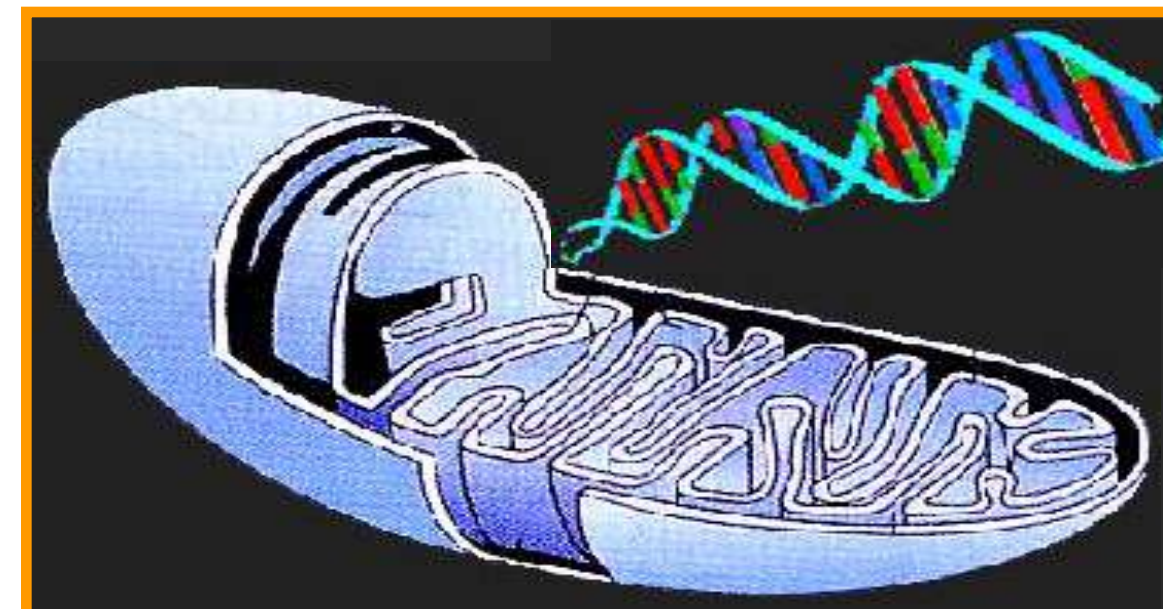
Autosomiche  
recessive



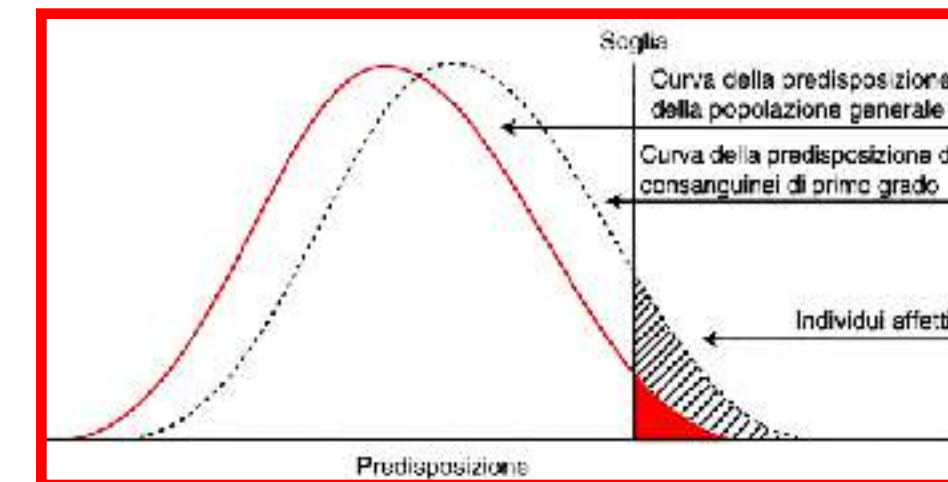
Legate ai  
cromosomi  
sessuali



Cromosomiche



Mitocondriali



Multifattoriali



DATA PRELIEVO \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

N. ID Lab. \_\_\_\_\_

Cognome e nome..... sesso **M** **F**  
nato/a a..... il ...../...../.....  
Recapito telefonico.....email .....

**TIPOLOGIA DI PRELIEVO, QUANTITÀ MINIMA E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE**

- Sangue periferico in EDTA (200-300ul) (T.A. nelle 24h o 4°C)
- DNA già estratto (1,5 ug)
- Tampone buccale (2) (T.A. nelle 24h o 4°C)
- altro, specificare: \_\_\_\_\_

Impegnativa **SI** **NO** Inviato da \_\_\_\_\_

Indicazione all'esame: \_\_\_\_\_

**Richiesta esame:**

- CARIOTIPO POST-NATALE STANDARD
- CARIOTIPO POST-NATALE AD ALTA RISOLUZIONE
- ANALISI MOLECOLARE GENE CFTR (MIM 602421) Reverse dot blot
- ANALISI MOLECOLARE GENE CFTR (MIM 602421) Sequenziamento automatico
- MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y Reverse dot blot
- ANALISI MOLECOLARE DEL GENE MEFV (MIM 608107) Reverse dot blot
- ANALISI MOLECOLARE DEL GENE GJB2 (MIM 121011) Sequenziamento automatico
- ANALISI MOLECOLARE DEL GENE GJB6 (MIM 604418) Sequenziamento automatico
- ANALISI MOLECOLARE DEI GENI GLOBINICI
- HBA1/HBA2 Reverse dot blot / Sequenziamento automatico
- HBB Reverse dot blot / Sequenziamento automatico
- HBD Sequenziamento automatico
- TROMBOFILIA EREDITARIA Reverse dot blot
- EMOCROMATOSI EREDITARIA Reverse dot blot
- ANALISI MOLECOLARE DEL GENE TPMT (MIM 602421) Reverse dot blot
- ALTRO ESAME \_\_\_\_\_

**NOTIZIE CLINICHE ED ALBERO GENEALOGICO:**

Esami in altra sede:

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Inviare eventuale **copia del referto** a:

**Firma dell'operatore che ha raccolto i dati** \_\_\_\_\_

**I test genetici comprendono esami eseguiti su DNA e RNA umano, sui cromosomi, sulle proteine o su qualsiasi altro prodotto genico allo scopo di individuare alterazioni del patrimonio genetico predisponenti allo sviluppo di malattie. I risultati ottenuti dai test genetici coinvolgono l'identità biologica non solo della singola persona, ma anche della sua famiglia. Tutti i risultati ottenuti dalle analisi genetiche, così come ogni altro atto medico, sono da considerarsi strettamente confidenziali e sottoposti al vincolo del segreto professionale e nel rispetto della privacy (D.L. n°196/03).**

**CONSENSO INFORMATO ALL'ESECUZIONE DI ANALISI GENETICHE**

Io sottoscritto/a (cognome e nome).....  
nato/a..... il...../...../.....  
*in qualità di padre/madre/ tutore del minore*.....  
nato/a..... il...../...../.....  
Residente in Via/Piazza..... n°.....  
CAP..... Città..... Provincia.....  
Telefono.....email.....

**DICHIARO:**

di aver ricevuto tutte le informazioni sulle finalità dell'esame, le modalità di esecuzione e le eventuali problematiche che possono derivare dall'esecuzione del test. Pertanto, in base all'informativa ricevuta, che ritengo completa ed esaustiva, ho compreso l'utilità ed i limiti dell'analisi genetica proposta.

**ACCONSENTO:**

**SI** **NO** al prelievo di materiale biologico per l'esecuzione del test genetico: \_\_\_\_\_

**SI** **NO** alla comunicazione dei risultati delle indagini diagnostiche al sottoscritto/a ed ai seguenti soggetti:

familiare: \_\_\_\_\_

medico Dott.: \_\_\_\_\_

**SI** **NO** che i risultati delle analisi siano utilizzati per eventuali indagini genetiche su altri membri a rischio della famiglia.

**SI** **NO** che il risultato del test venga registrato nei registri nazionali delle patologie associate o trasferito ad altro centro per motivi di approfondimento diagnostico o ricerca.

**SI** **NO** che il campione biologico venga conservato ed utilizzato a scopo di ricerca presso il nostro laboratorio e che gli eventuali risultati possano essere pubblicati su riviste scientifiche, una volta resi anonimi.

**SI** **NO** di venire informato di eventuali risultati inattesi derivanti dalle indagini effettuate o su nuove possibilità diagnostiche derivanti dai suddetti studi e da ricerche future.


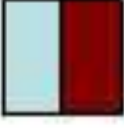
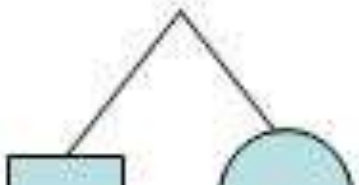


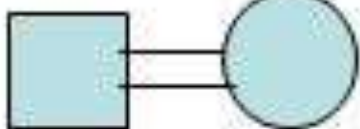
**Mi impegno infine, a comunicare tempestivamente ogni eventuale cambiamento di opinione in merito a quanto dichiarato.**

**Firma dell'interessato (o di chi ne fa le veci)** \_\_\_\_\_

**Firma dell'operatore che ha raccolto il consenso** \_\_\_\_\_



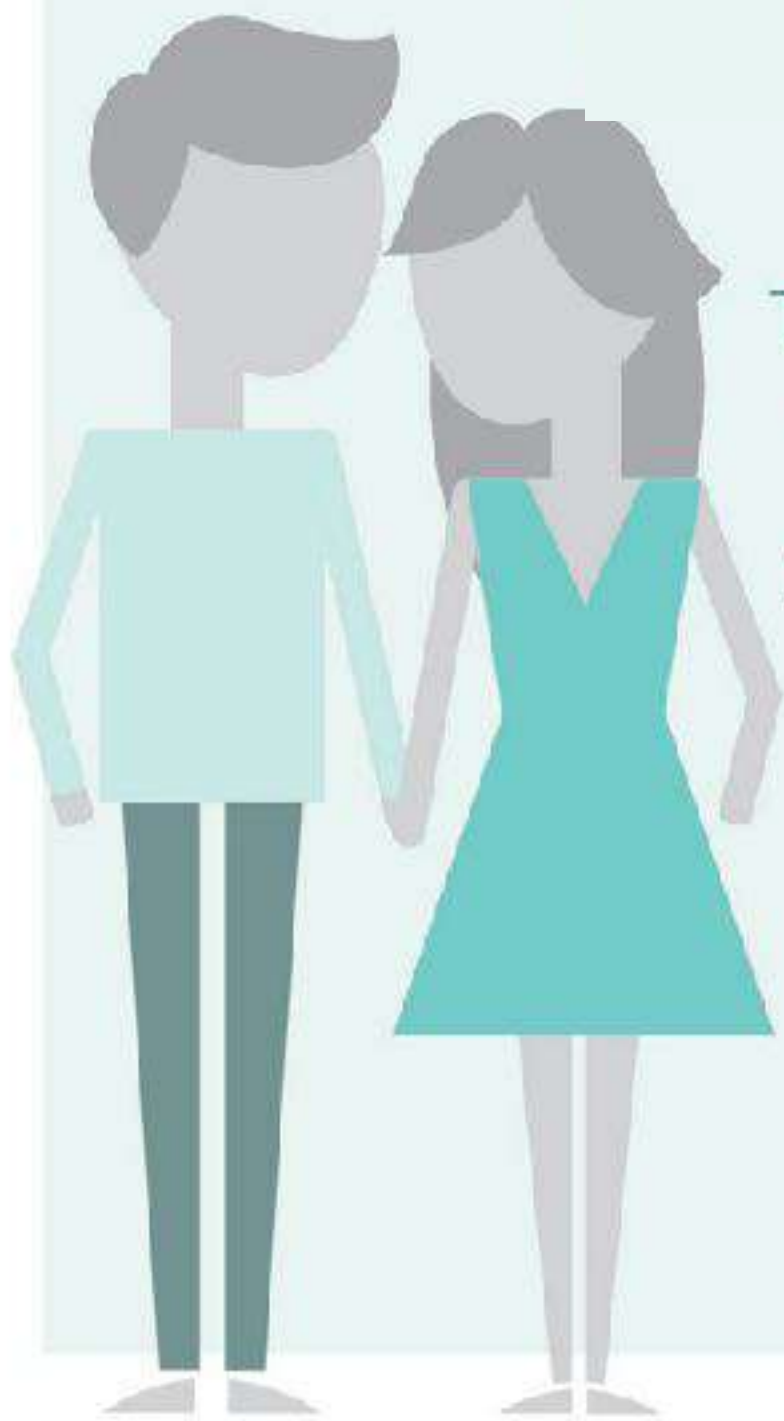
# Simboli usati nell'analisi degli alberi genealogici umani

	Maschio		Sesso non determinato
	Femmina	 	Numero di figli del sesso
	Incroccio	 	Individui affetti
	Genitori con 1 bambino ed 1 bambina	 	Eterozigoti per un gene autosomico recessivo
	Genitori con 1 bambino ed 1 bambina		Portatrice di un gene recessivo Legato al sesso
	Gemelli dizigoti		Morte
	Gemelli monozigoti		Aborto o nato morto (sesso non determinato)
			Incroccio tra consanguinei



# Il percorso genetico prenatale

## Carrier test



Test di screening che permette alla coppia di sapere se si è portatori sani di una o più malattie genetiche ereditarie

Per la **COPPIA** che desidera un figlio

PERIODO PRECONCEZIONALE

## Test di screening

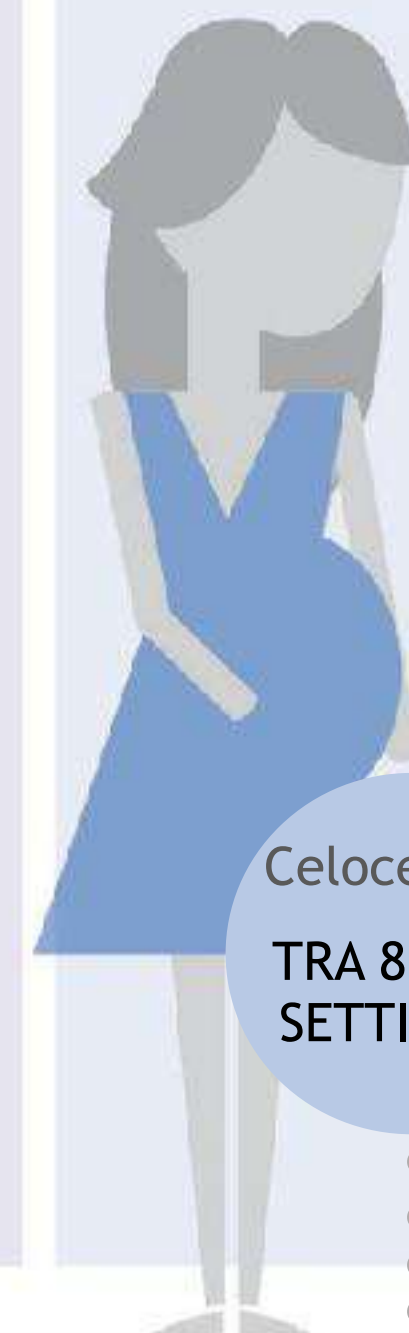


Test di screening prenatale che si esegue tramite un semplice prelievo di sangue materno

Dalla **9° SETTIMANA** di gestazione

PERIODO PRENATALE

## Test diagnostico



Celocentesi  
TRA 8° e 9°  
SETTIMANA

Prelievo di villi coriali  
TRA 11° e 13°  
SETTIMANA

Prelievo di liquido amniotico  
TRA 16° e 18°  
SETTIMANA





# Are e metodiche

---

## CITOGENETICA CLASSICA:

Cariotipo (400 bande)

Cariotipo ad alta Risoluzione (800 bande)-

*soggetti in età pediatrica con ritardo mentale, poliabortività*

## CITOGENETICA MOLECOLARE:

FISH (fluorescence in situ hybridization)

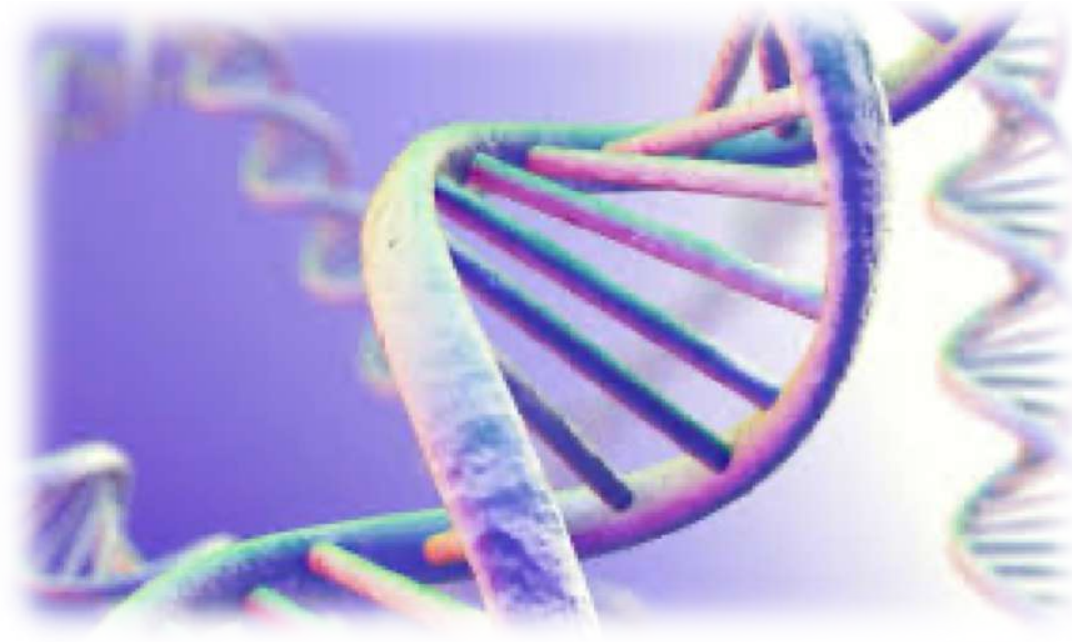
CGH Array (Cariotipo Molecolare)

SNP Array

## GENETICA MOLECOLARE:

- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Amplification Refractory Mutation System (ARMS)
- Reverse Dot Blot (RDB)
- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)
- Sequenziamento automatico
- Next Generation Sequencing (NGS)
- Whole Exome Sequencing (WES)
- Whole Genome Sequencing (WGS)





## Test genetici eseguiti presso i laboratori di Genetica medica dell'AOU

---

**Fibrosi cistica (CFTR)**

**Febbre familiare mediterranea (MEFV)**

**Sindrome dell'X-fragile (FMR1)**

**Microdelezioni cromosoma Y**

**Sordità neurosensoriale (GJB2, GJB6)**

**Talassemia (HBB, HBA, HBD)**

**Trombofilia (FV, FII, MTHFR)**

**Emocromatosi Ereditaria (HFE, TFR2, FPN1)**

**Iperferritinemia e cataratta congenita (5' UTR-FTL)**

**Anemia da deficit marziale refrattaria alla terapia con ferro (IRIDA, TMPRSS6)**

**Test di Farmacogenetica: TPMT, recettore FSH**

**Cariotipo standard e ad alta risoluzione**

**Array CGH**





## Prelievo per test genetici in epoca prenatale

---

- Blastomeri (Diagnosi Genetica Preimpianto, 3° giorno)
- Liquido celomatico (entro la 9° settimana di gestazione)
- DNA fetale circolante (PrenatalSafe 10° settimana di gestazione)
- Villi coriali (10°-13° settimana di gestazione)
- Cellule del liquido amniotico (15°-18° settimana di gestazione)
- Sangue fetale (Cordoncentesi o Funicolocentesi 18°-20° settimana di gestazione)
- ***Materiale abortivo***





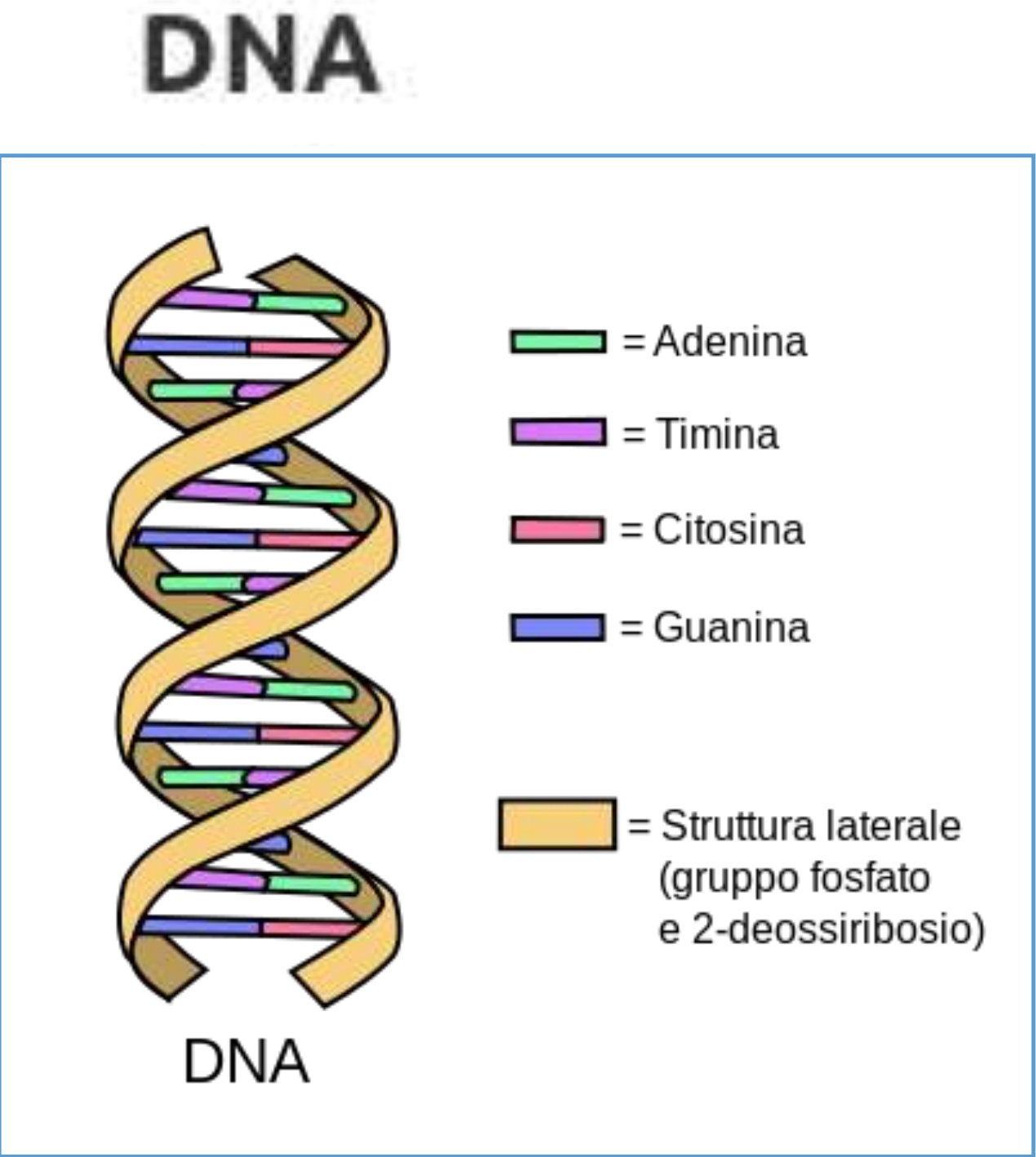
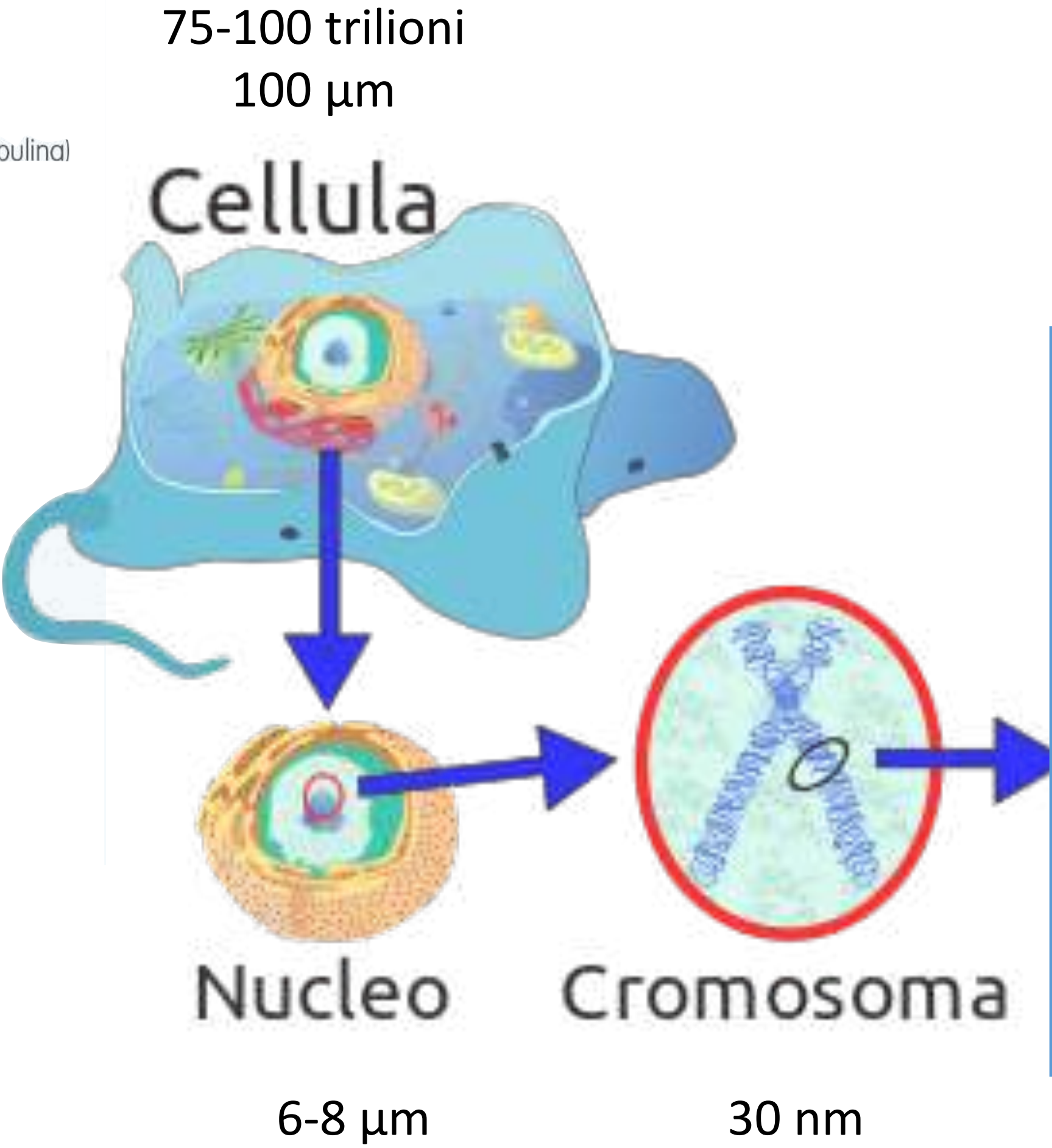
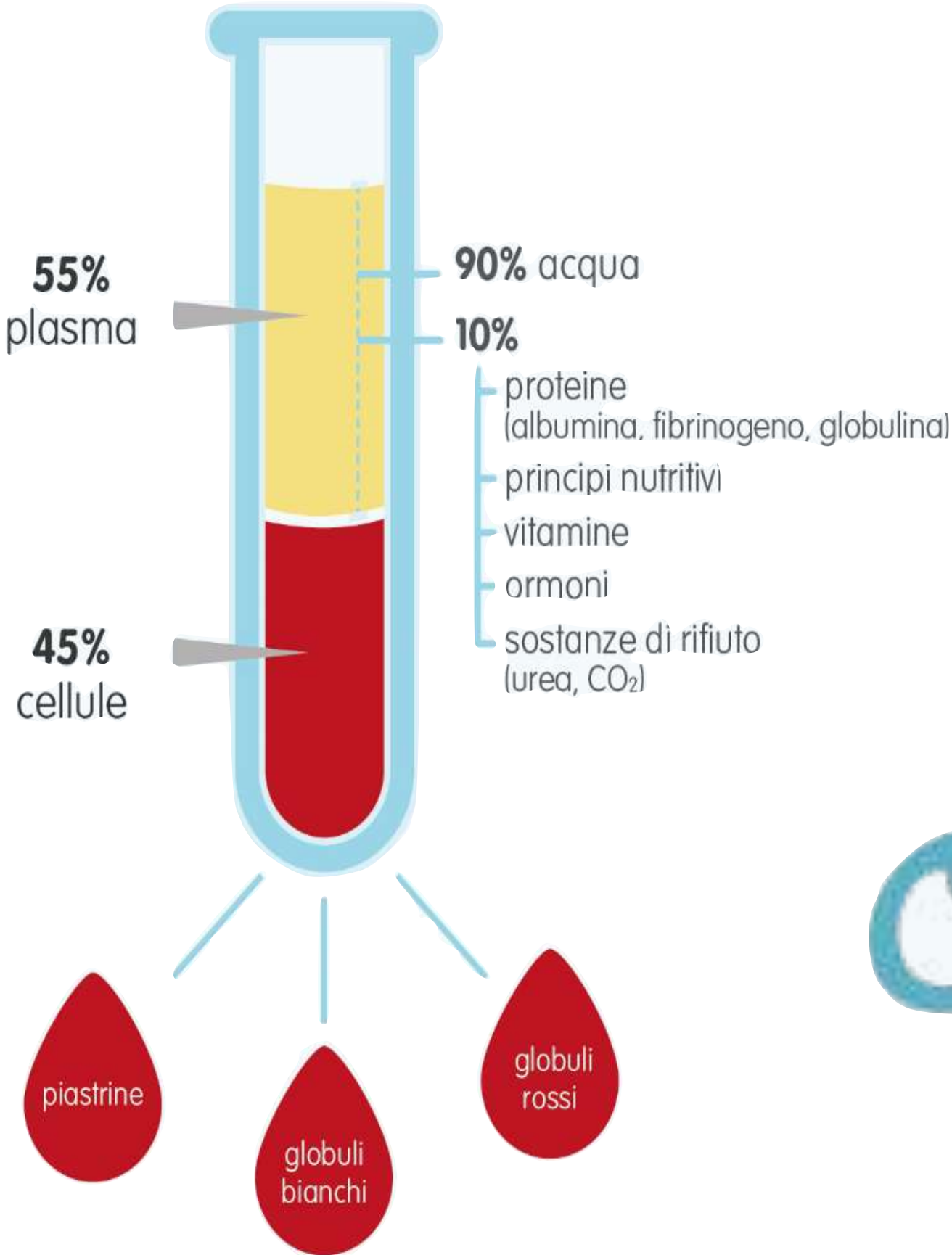
## Prelievo per test genetici in epoca post-natale

---

- sangue periferico
- biopsie tissutali
- tampone buccale
- tracce biologiche (capelli, sperma, ecc..)



# Materiale in analisi



1 m





# Prelievo per test di genetica molecolare

---



**Provetta con EDTA**



**Può essere congelato per aumentare la resa di DNA estratto**



**Conservato per lunghi periodi a -20°C**

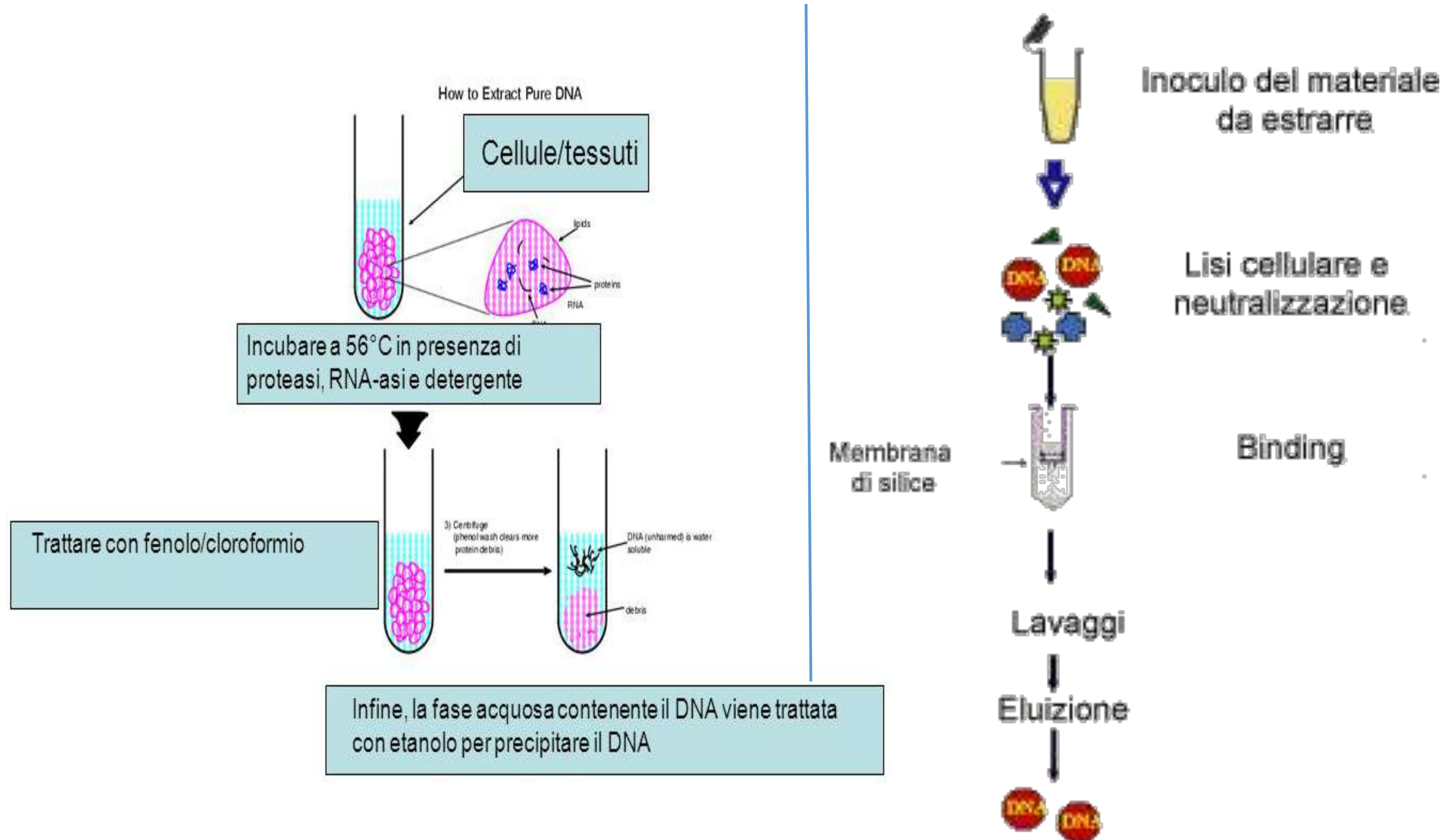
**IN ALTERNATIVA IL TAMPONE BUCCALE E' UNA TECNICA MENO INVASIVA**



**RESA INFERIORE MA SUFFICIENTE PER L'ESECUZIONE DI MOLTI TEST GENETICI**

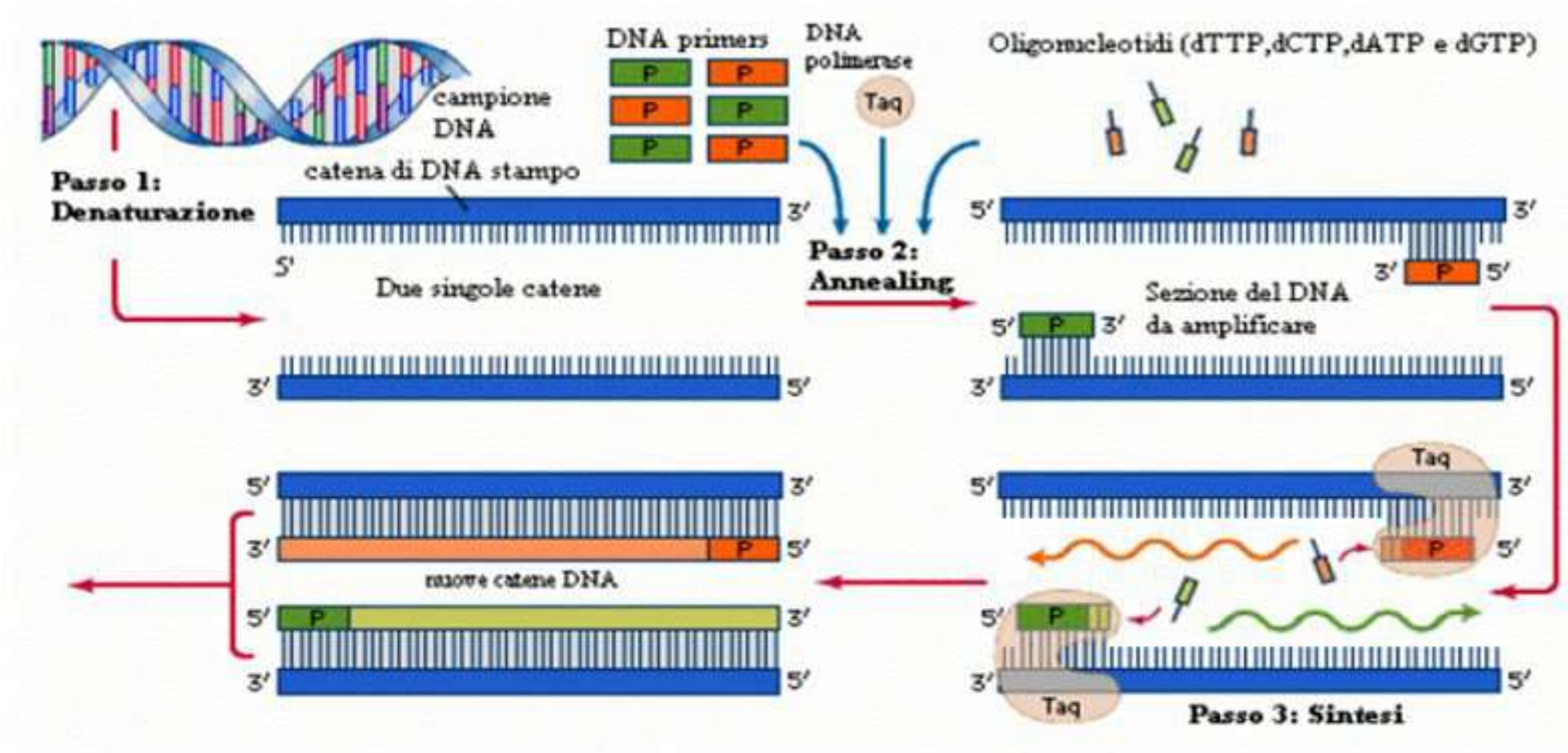
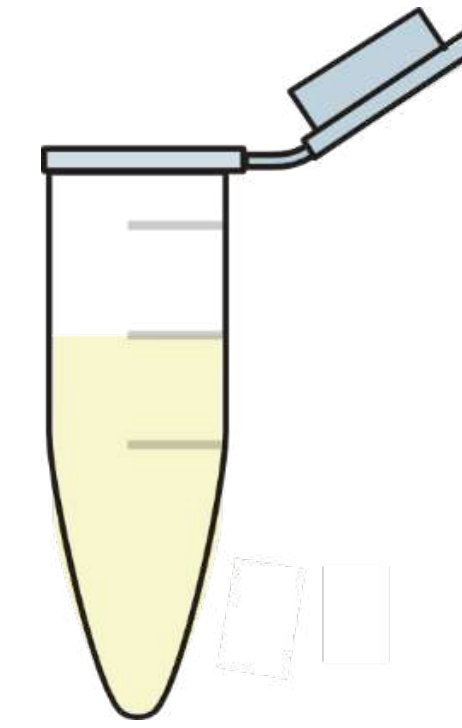


# Estrazione DNA



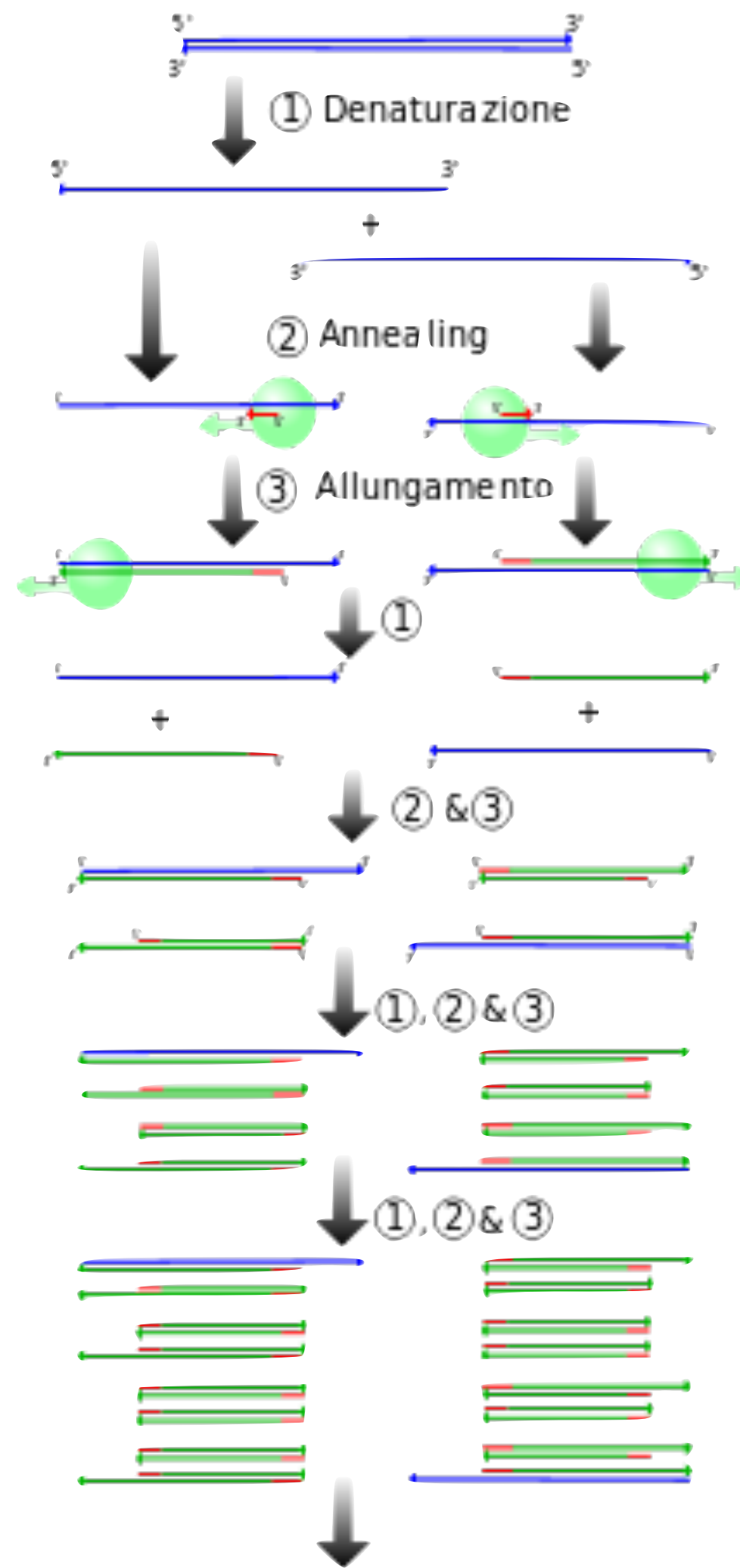


# Amplificare il DNA

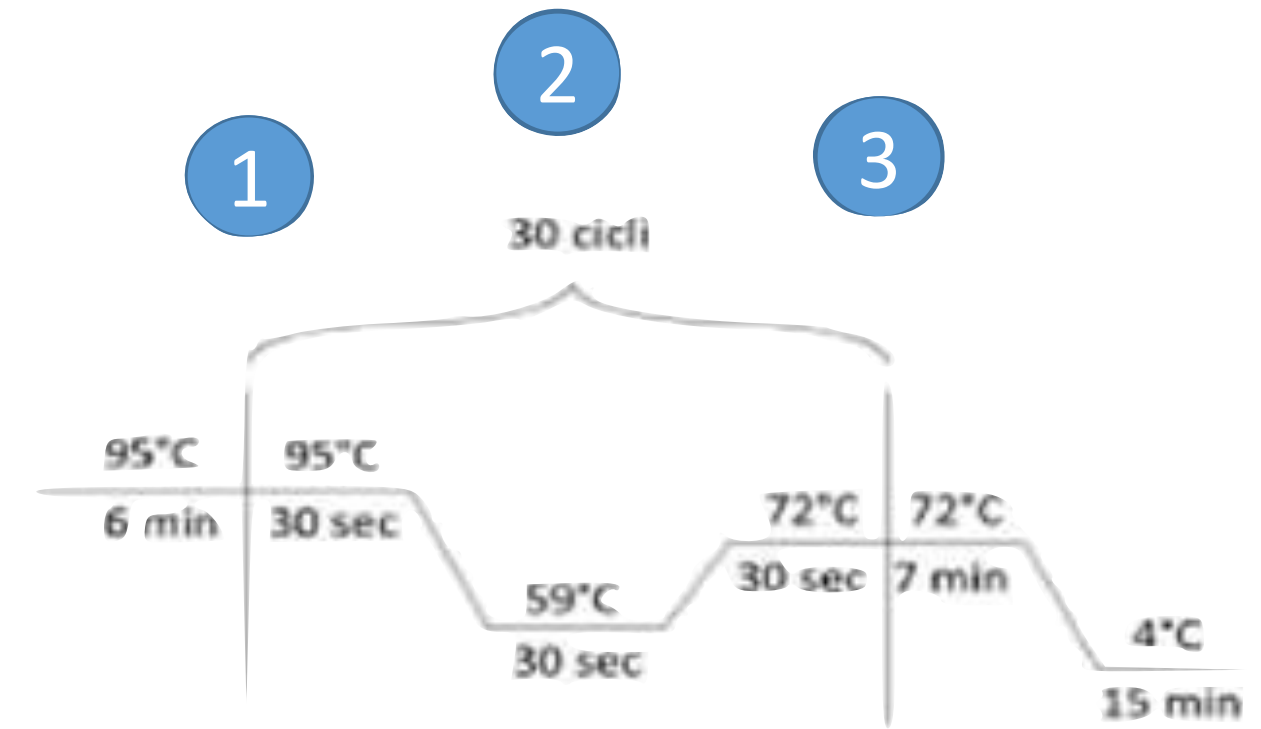




# Polimerase Chain Reaction



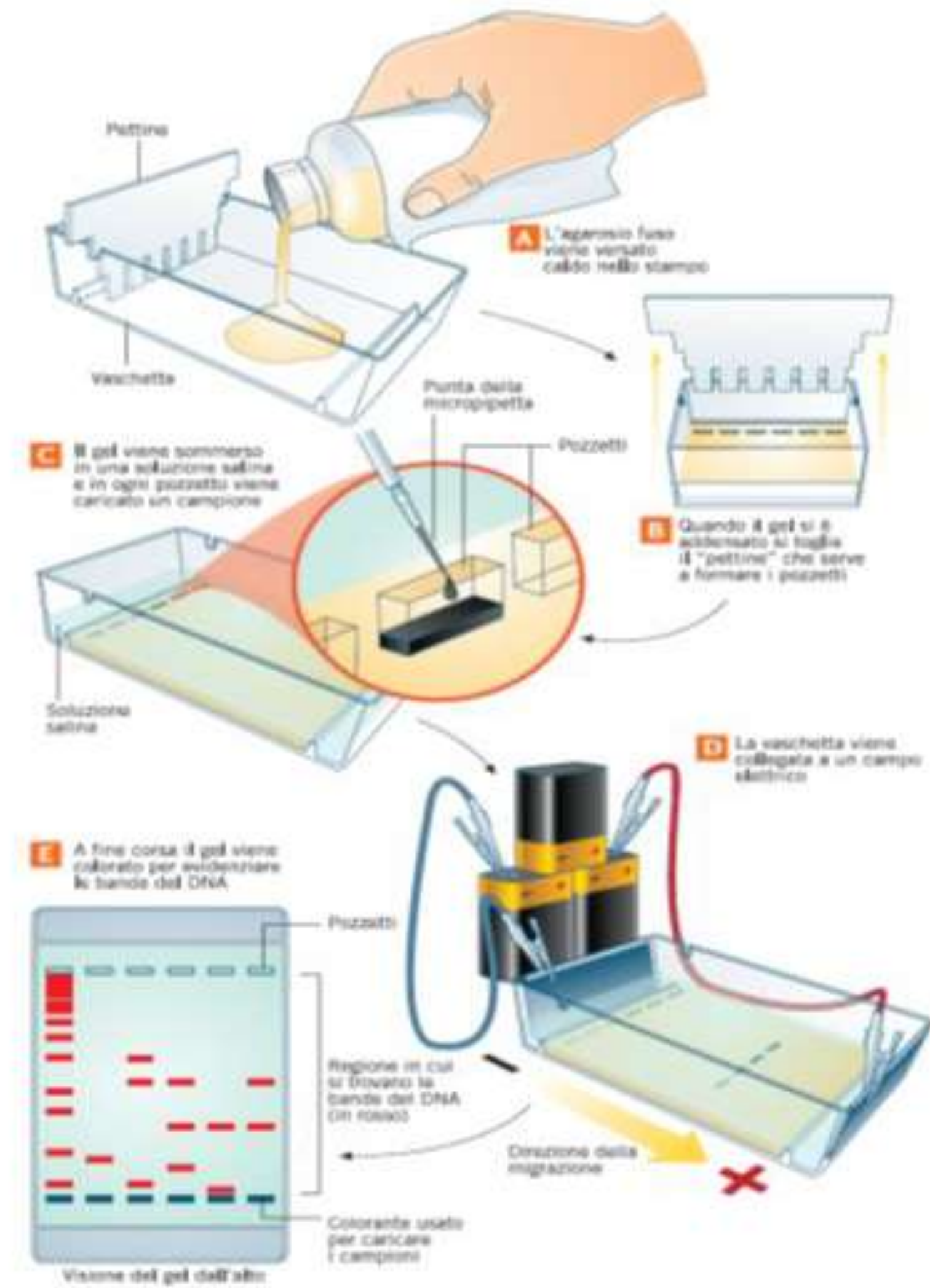
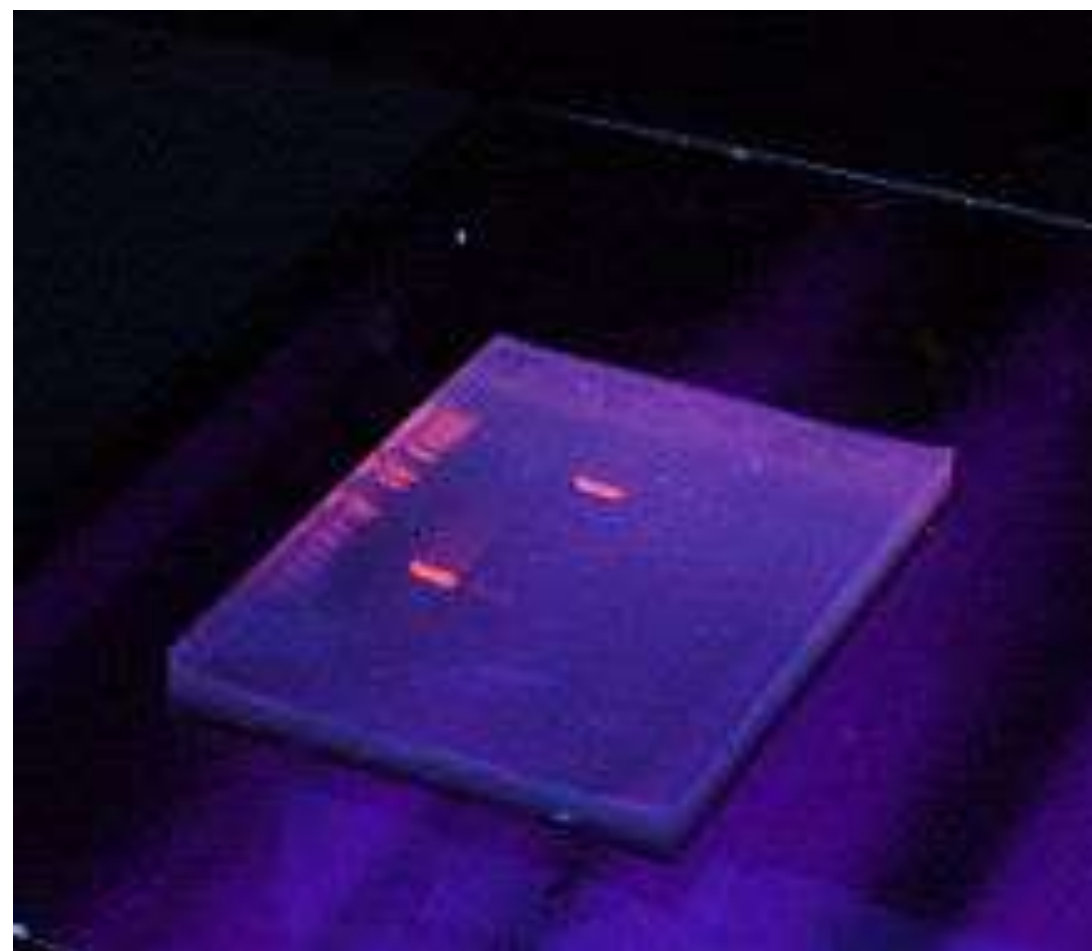
Crescita esponenziale dei segmenti prodotti





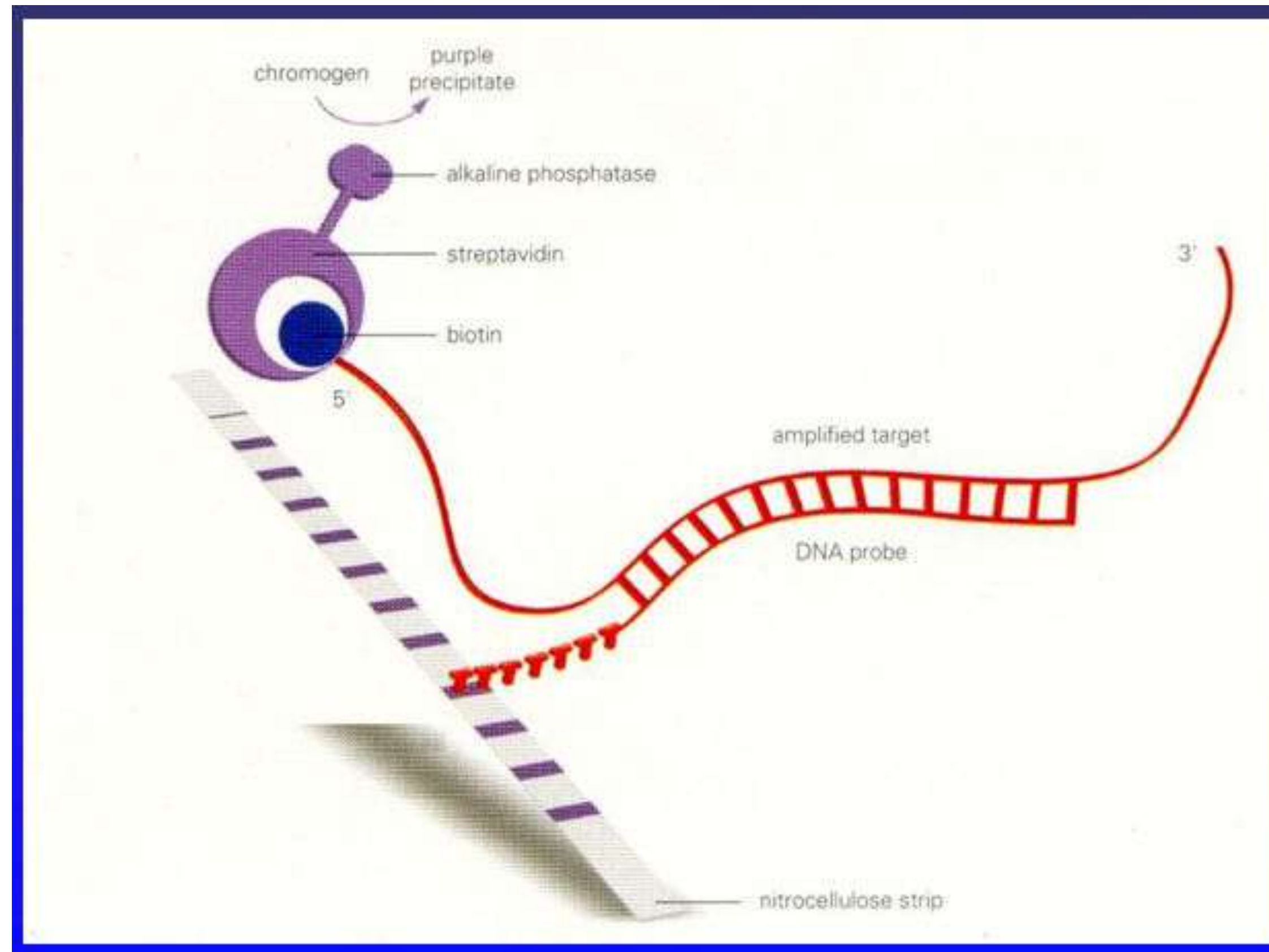
# Elettroforesi su gel d'agarosio

L'elettroforesi su gel è una tecnica utilizzata per **separare** frammenti di DNA in funzione delle loro diverse **dimensioni**.



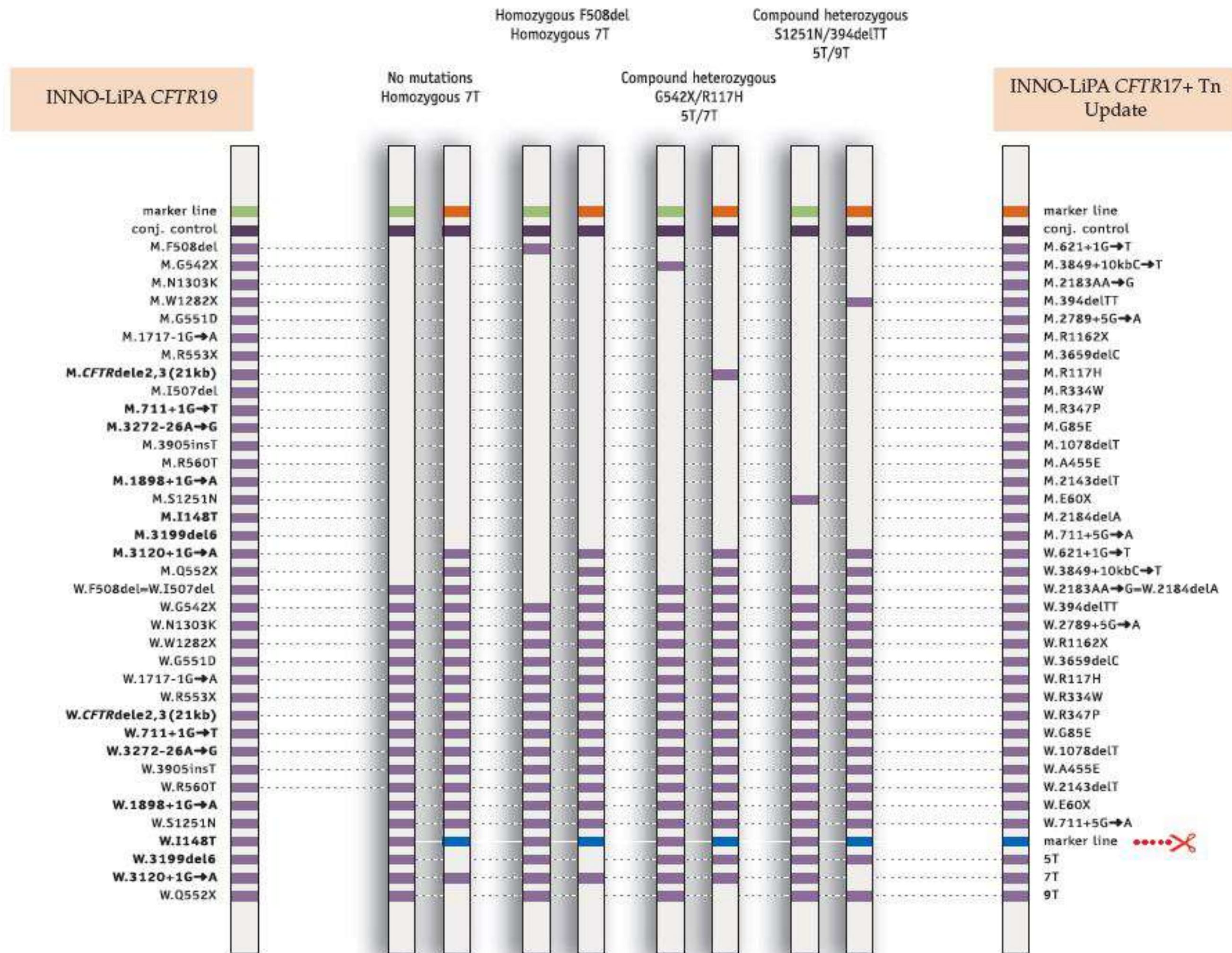


# Ibridazione inversa su striscia





# Interpretazione dei risultati





# Sequenziamento di un gene di interesse



- Scelta del target



- Disegno dei primers



- Estrazione DNA



- Amplificazione della regione target



- Verifica dell'amplificato su gel d'agarosio



- Purifica dell'amplificato



- Reazione di sequenziamento



- Purifica della reazione di sequenza

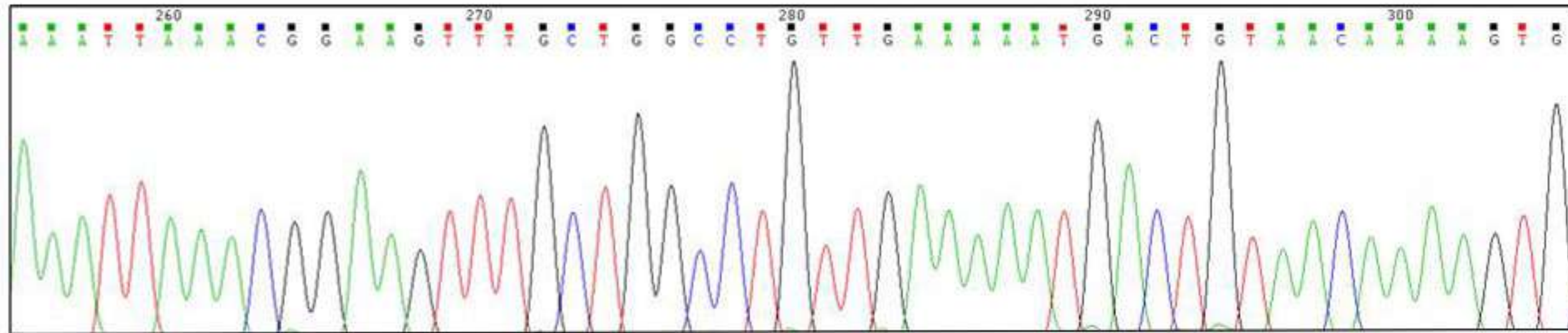


- Elettroforesi capillare

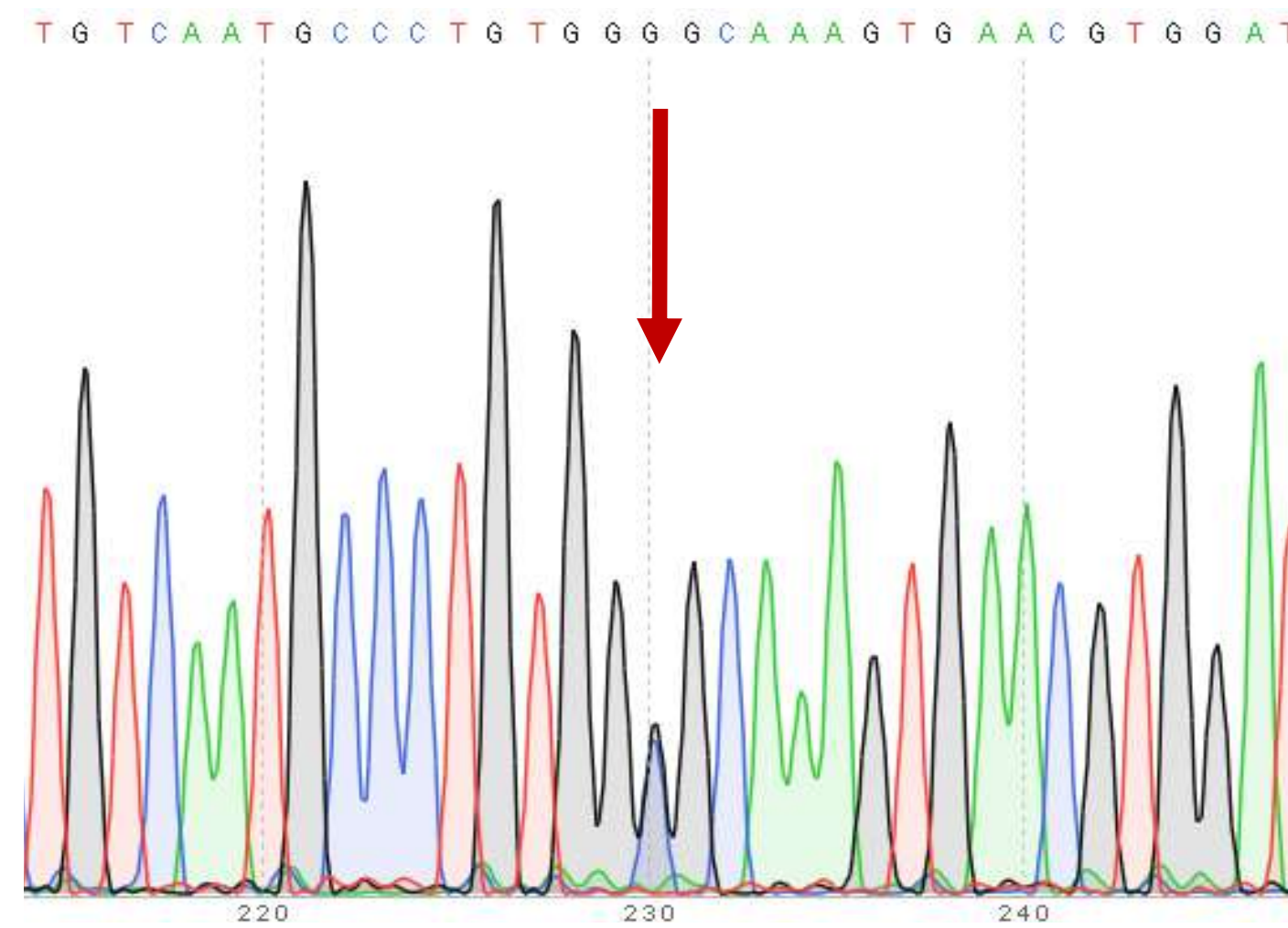


# Elettroferogramma

**Genotipo WILD TYPE**



**Genotipo MUTATO**





# FMR1 GENE

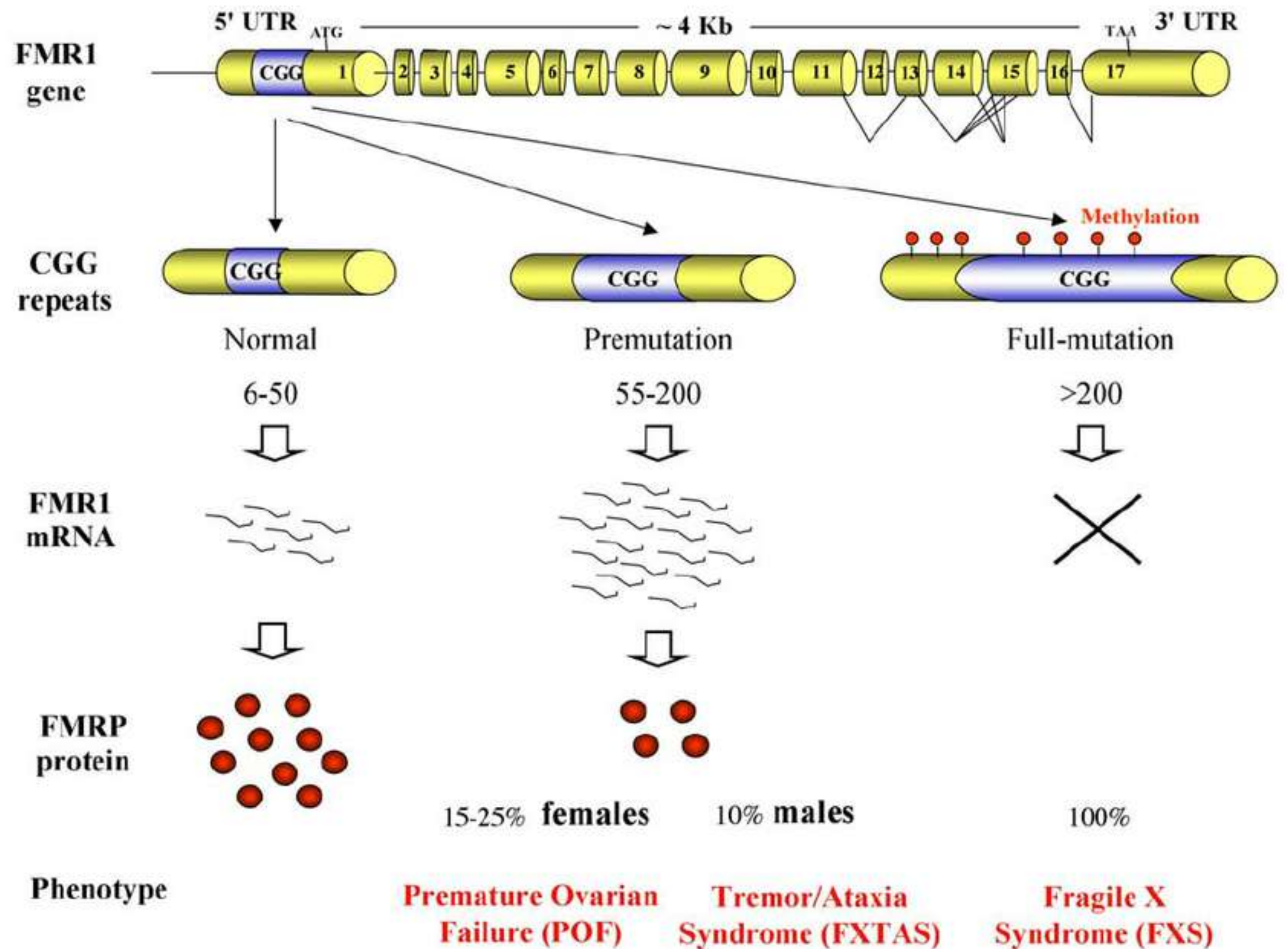
## Xq27.3

Ripetizione di tripletta nella regione 5'UTR

- WILD TYPE: fra 5 e 44
- ZONA GRIGIA: fra 45 e 55
- PREMUTAZIONE: fra 55 e 200
- FULL MUTAZIONE: da 200 in poi

### FMR PROTEIN

FMRP è una proteina legante gli RNA (RNA-binding protein) espressa soprattutto nei testicoli e nel cervello, i tessuti più colpiti dalla sindrome. FMRP si associa ad RNA messaggeri codificanti importanti proteine neuronali, e ne regola alcuni aspetti essenziali, quali il trasporto lungo i dendriti verso le sinapsi e la traduzione in proteine. In assenza di FMRP, molti degli RNA messaggeri bersaglio della proteina sono deregolati e sono maggiormente tradotti in proteina. Emergono inoltre nuove funzioni molecolari della proteina, quali la regolazione della stabilità degli RNA messaggeri.

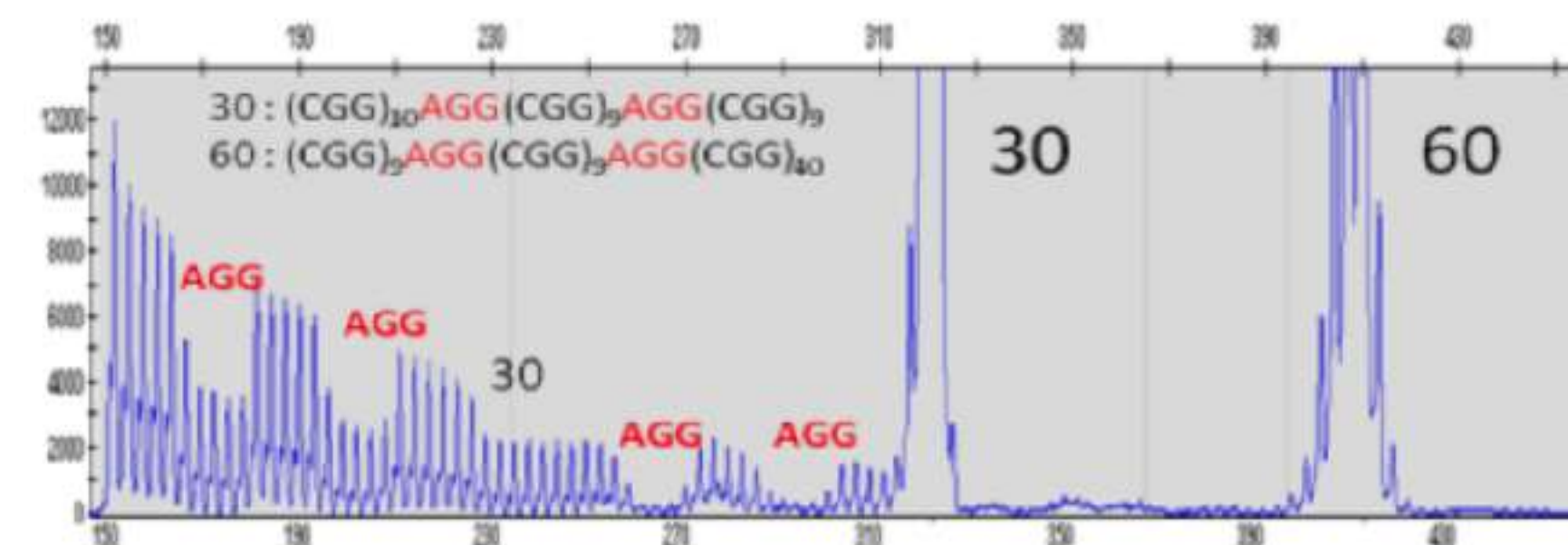
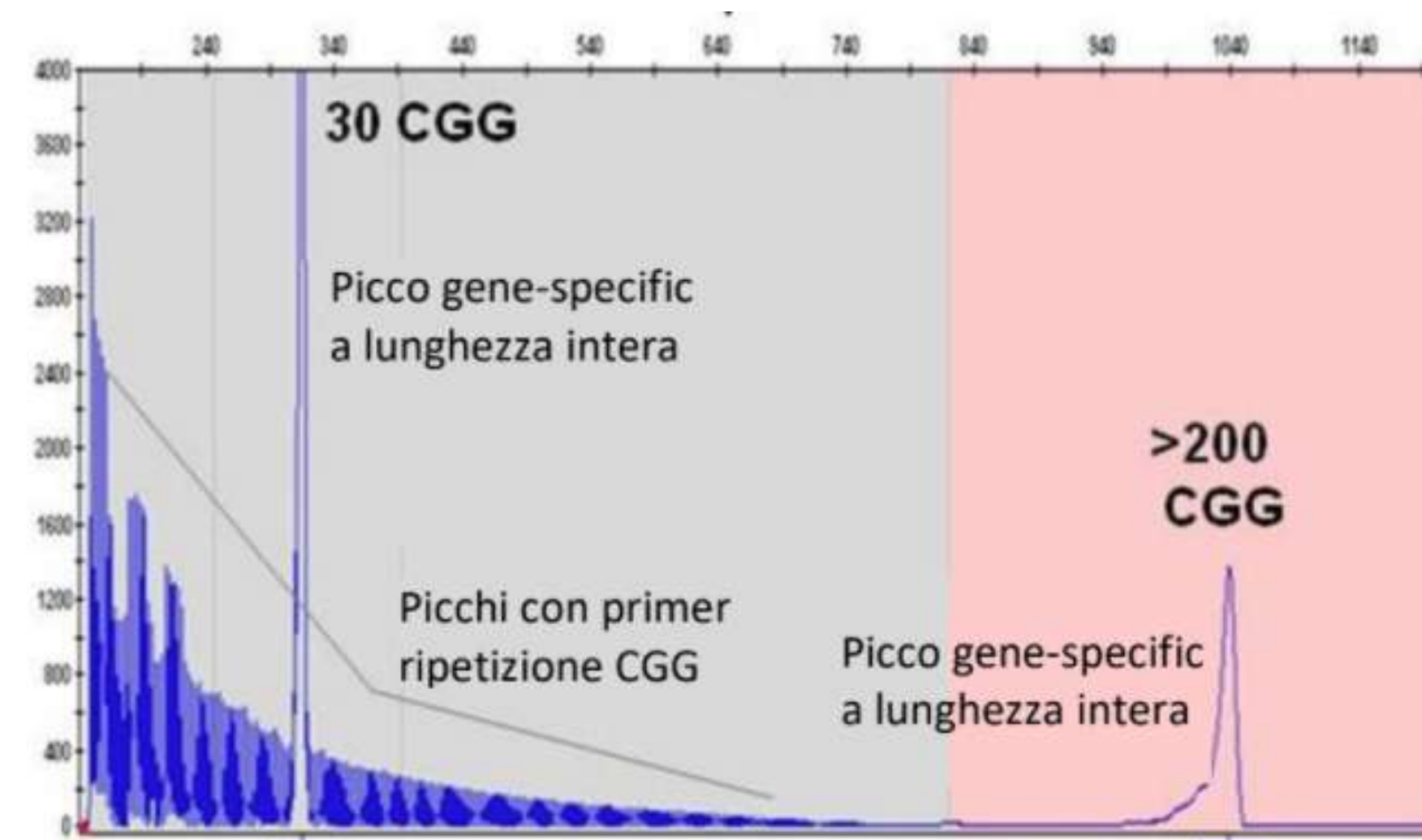




# ELETTROFORESI CAPILLARE

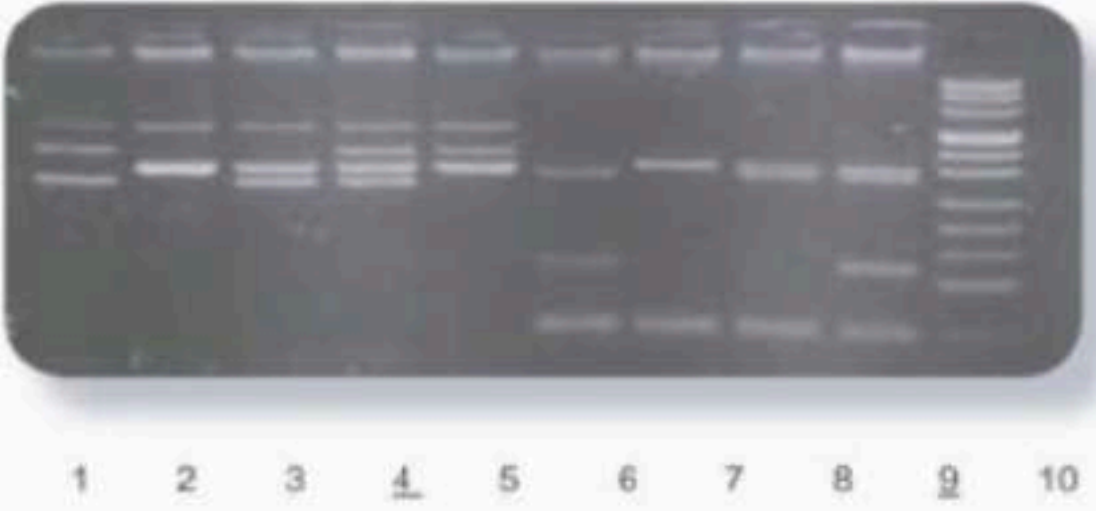
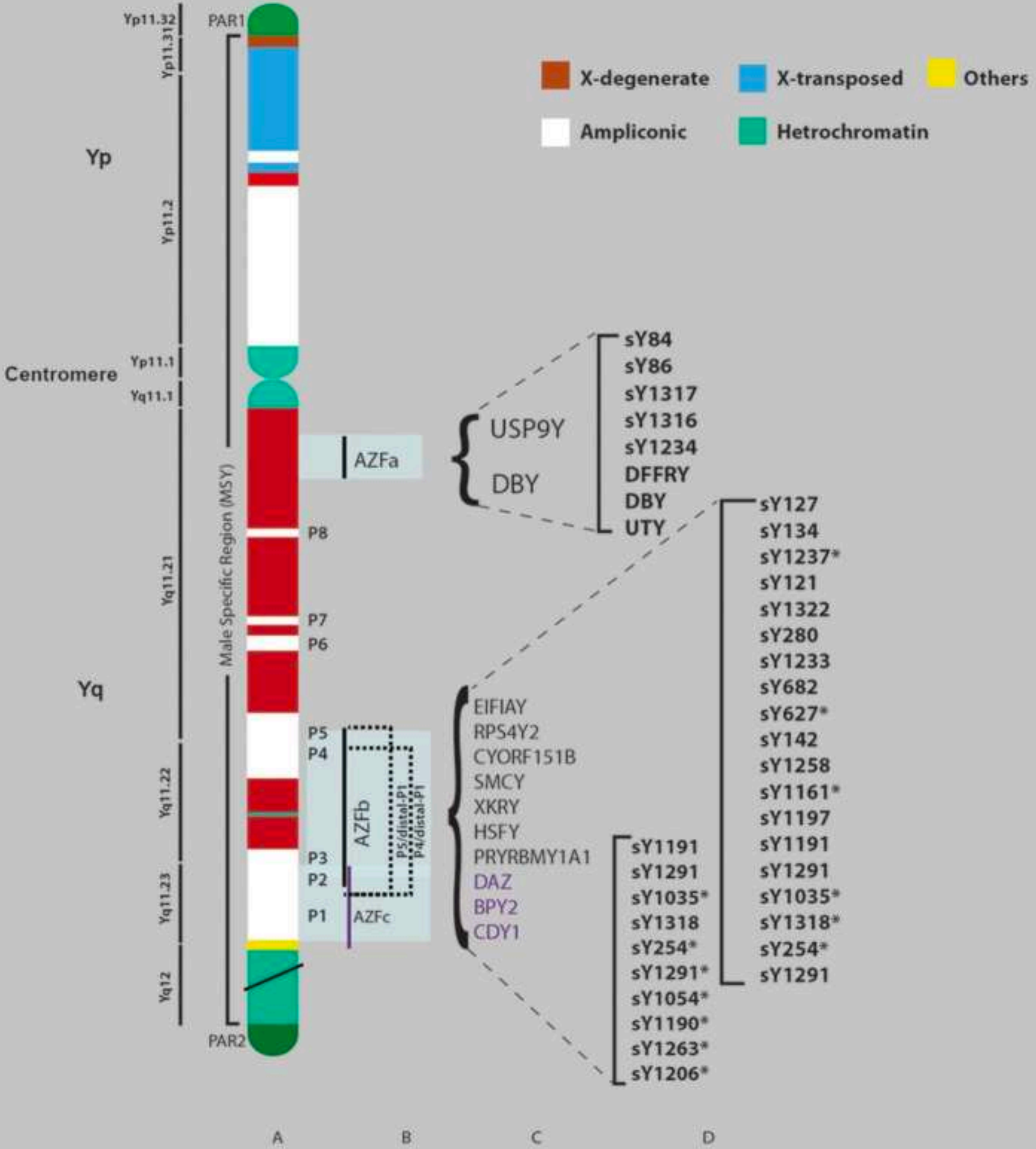
I picchi della PCR gene specific sono associati a valori espressi in bp che devono essere trasformati in numero di ripetizioni CGG.

Il Primer FMR1 CGG (o terzo primer) è specifico per la regione ripetuta CGG e quindi non sarà in grado di ibridarsi alle sequenze AGG, che sono spesso presenti nel gene FMR1. Pertanto, le riduzioni dell'intensità del segnale nel profilo CGG RP PCR corrispondono alla presenza di interruzioni AGG.

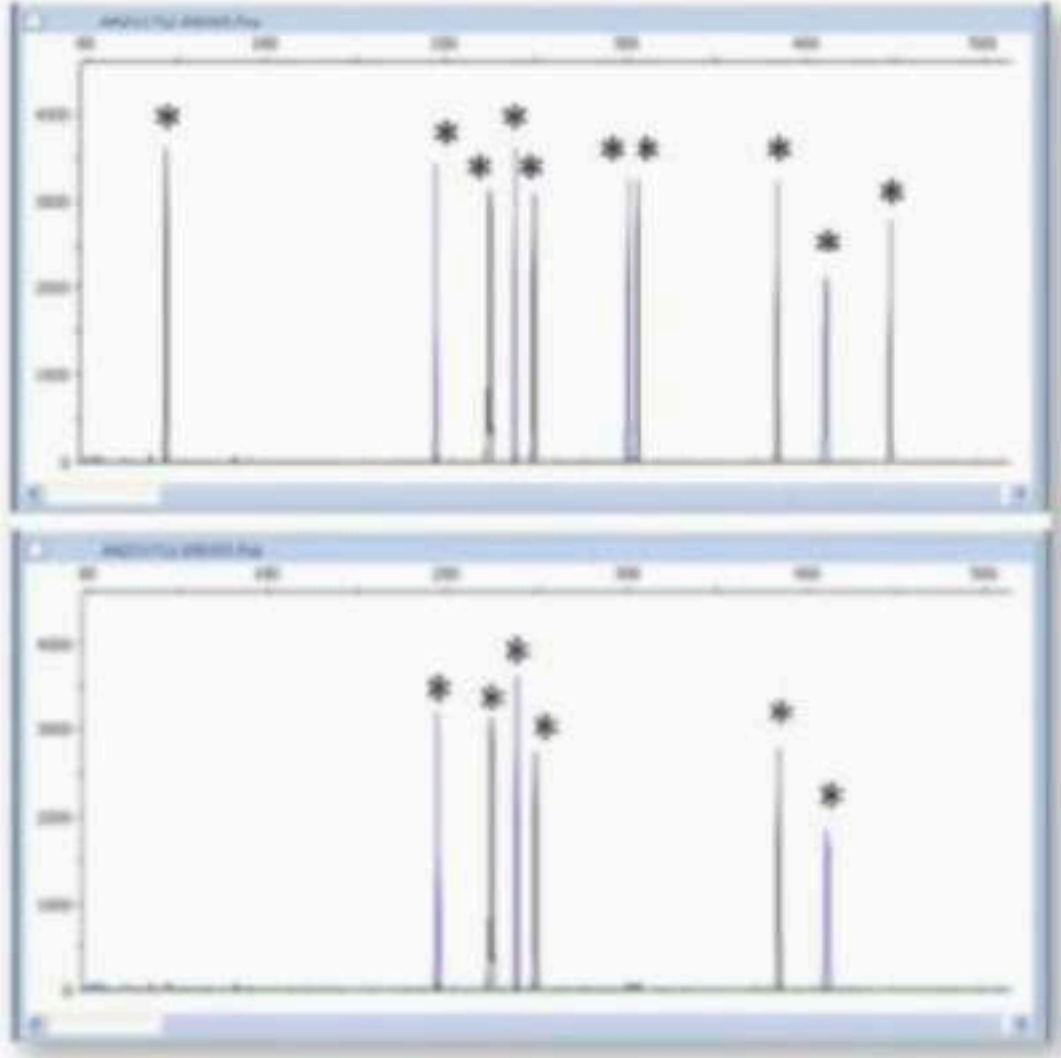




# Microdelezioni cromosoma Y



Multimix A: 4 normal male 1,2,3,5 males with deletions  
 Multimix B: 9 normal male 6,7,8 , males with deletions  
 10 marker ladder

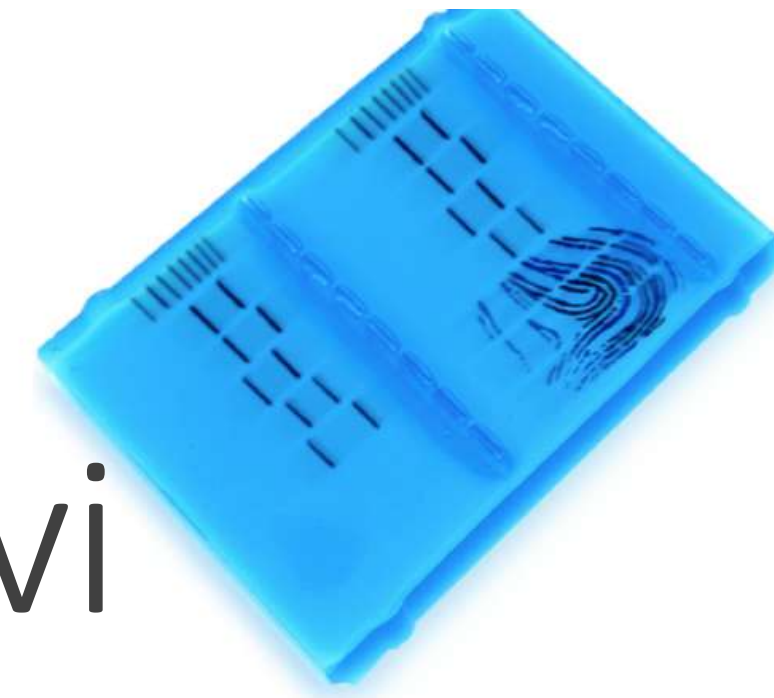


Electropherograms of a fertile male DNA sample and of a AZFc region deleted sample

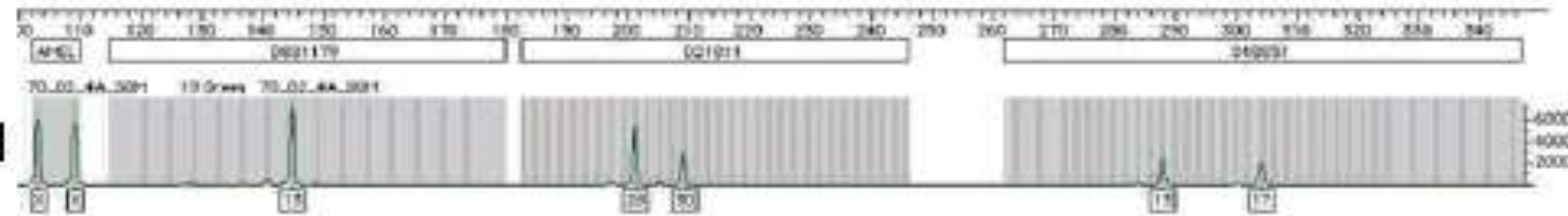




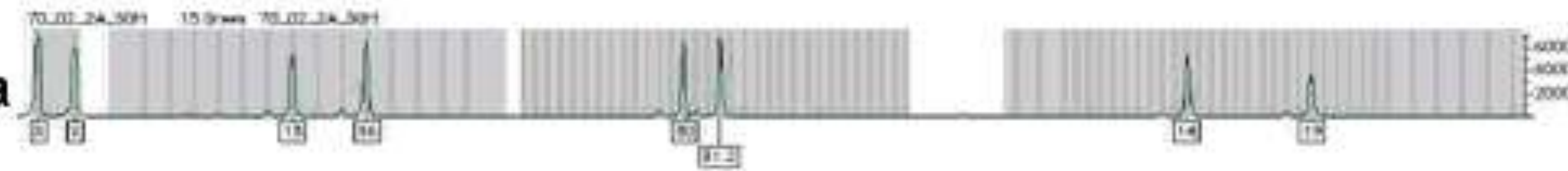
# Analisi DNA a fini identificativi



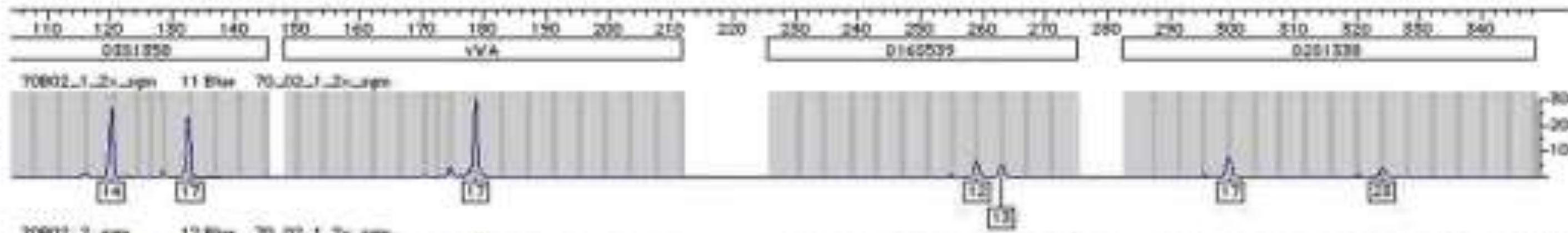
Sogg. n.1



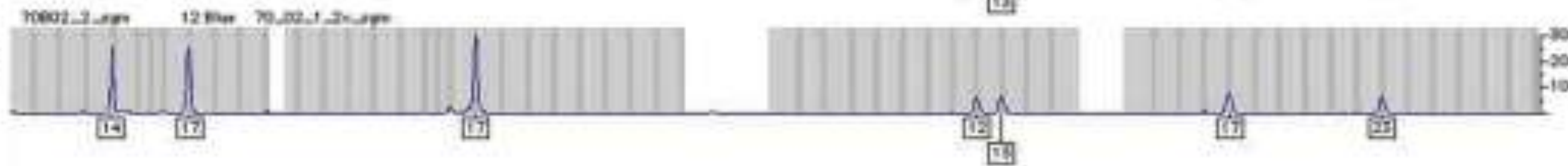
Traccia



Sogg. n.1

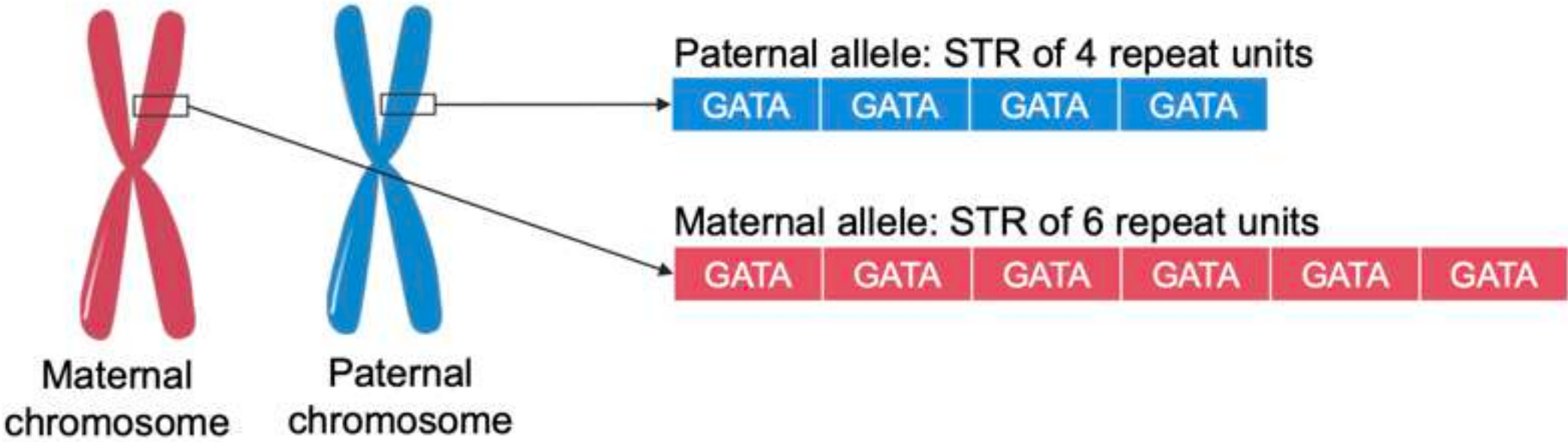


Traccia

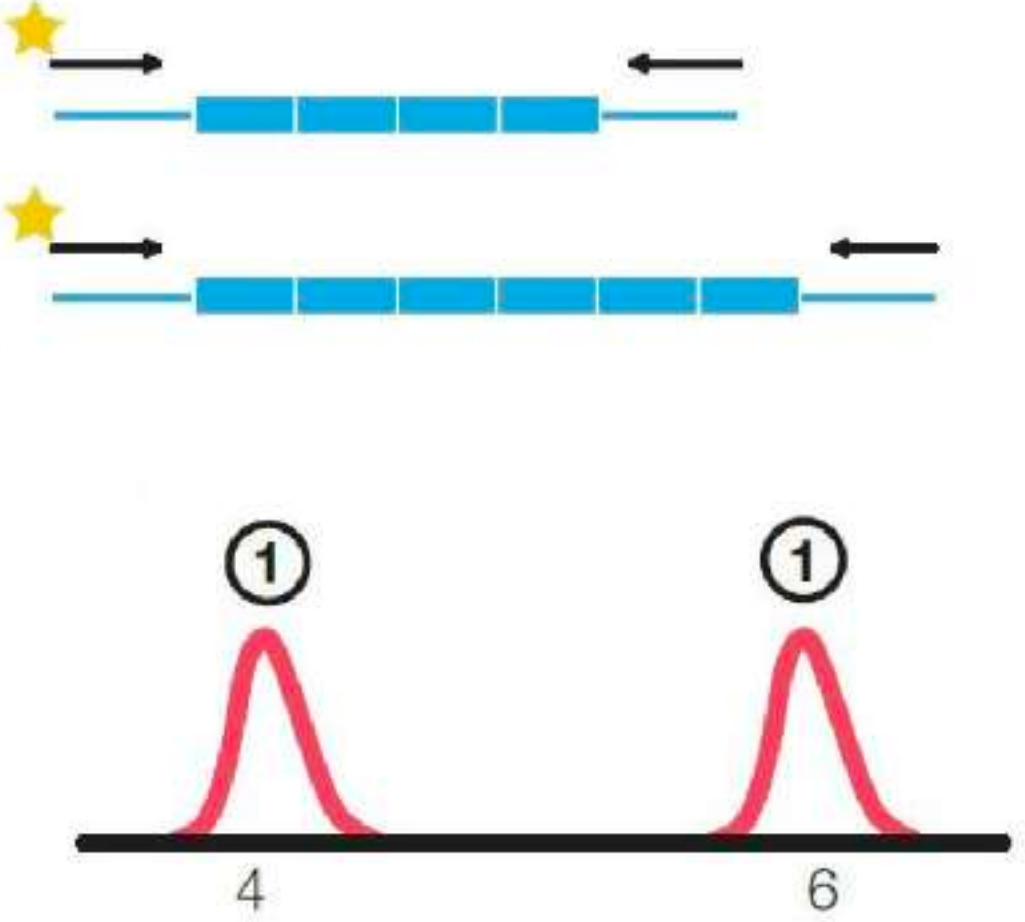
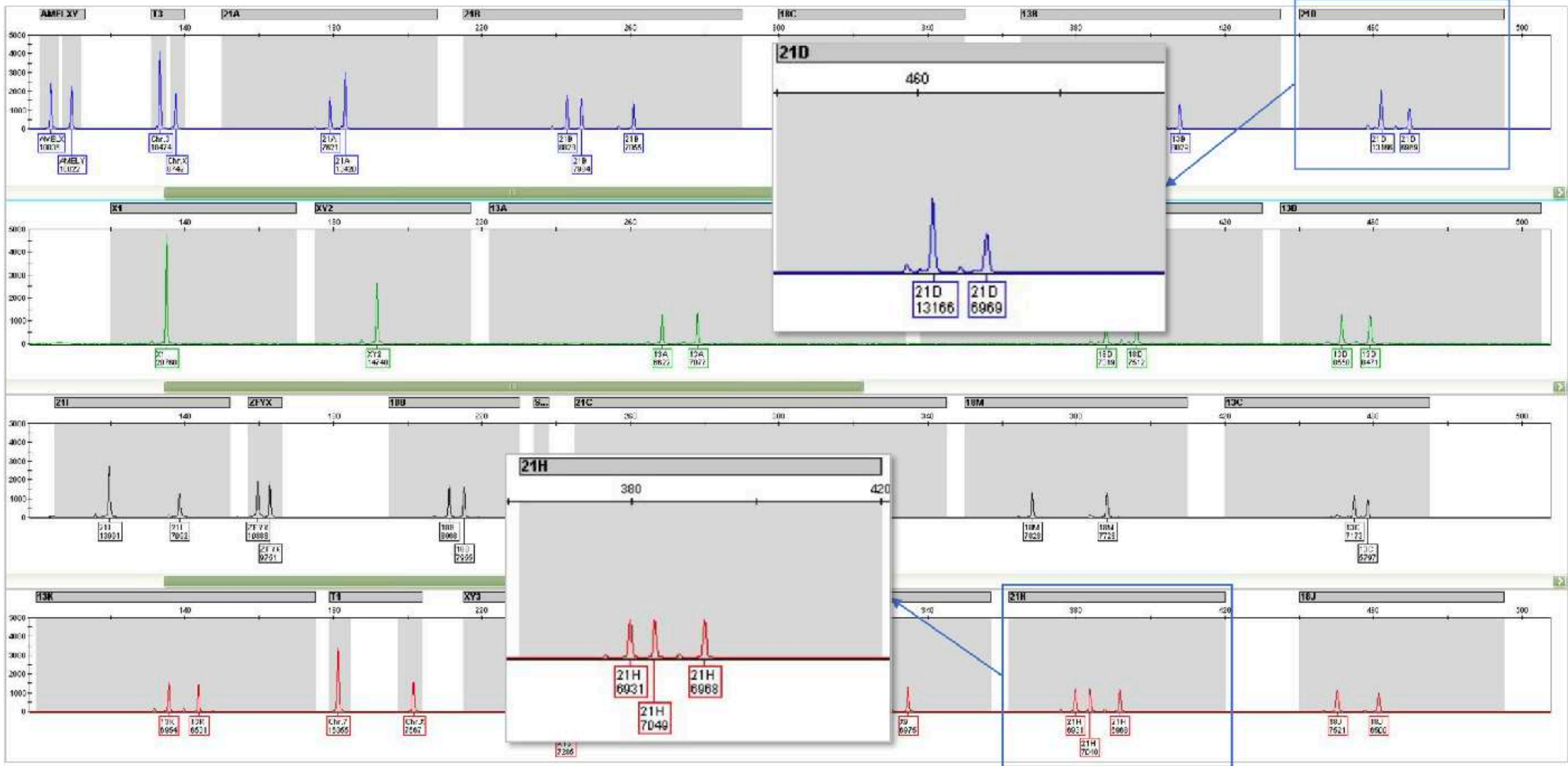




# QF-PCR per la diagnosi di aneuploidie



## TRISOMY 21 (XY, +21)





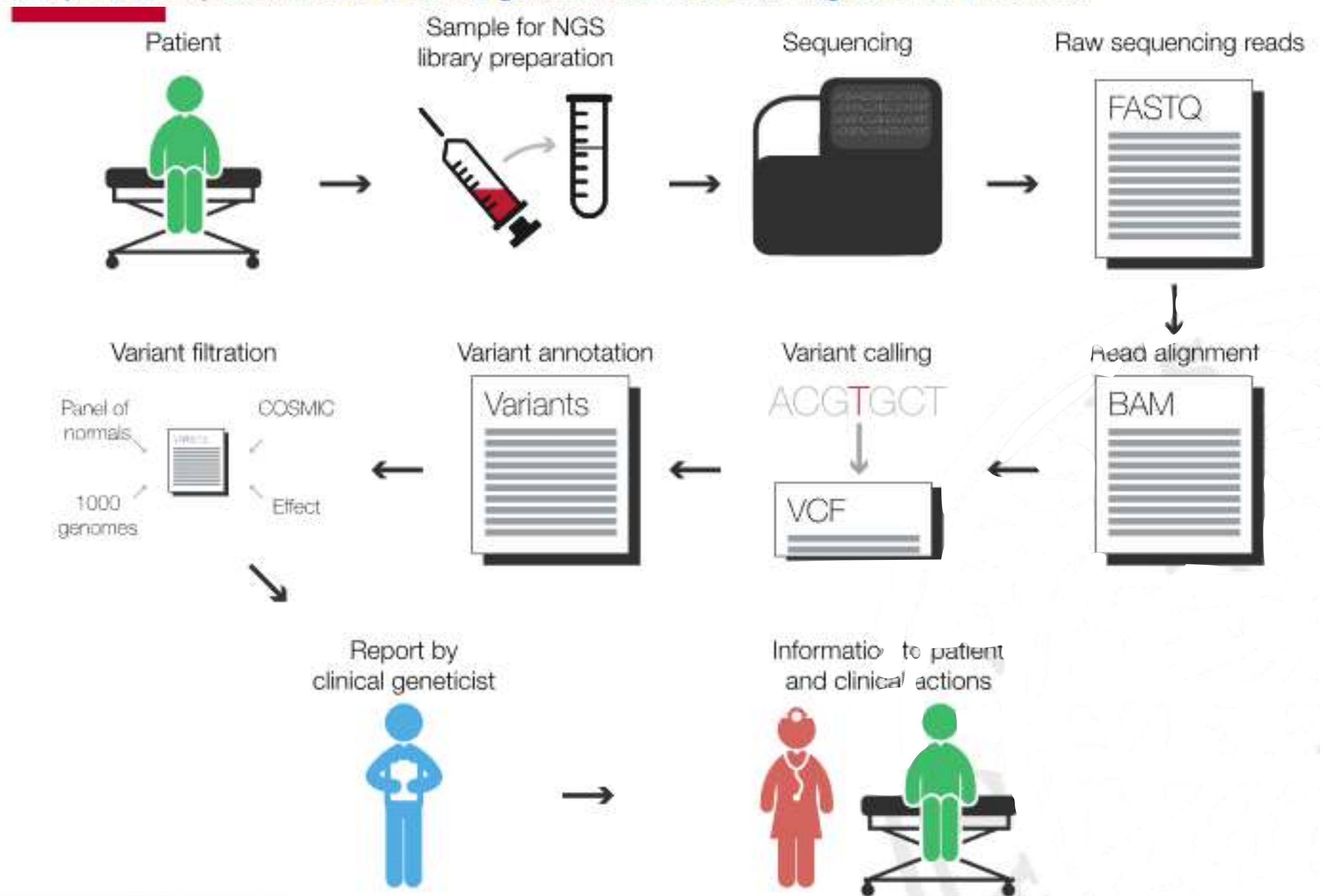
# Next generation sequencing

Il DNA si legge con strumenti chiamati "sequenziatori". Tra il 2004 e il 2006, sono state messe a punto **nuove metodiche di sequenziamento**, basate su principi chimici differenti dal metodo di sequenziamento tradizionale, detto "Sanger" dal nome dello scienziato premio Nobel che lo inventò. Per questo motivo si parla di **sequenziamento di nuova generazione del DNA**, in inglese **Next Generation Sequencing (NGS)**.

UN SEQUENZIATORE CLASSICO DEL 2000



One region in one patient  
Robust  
Manual analysis possible



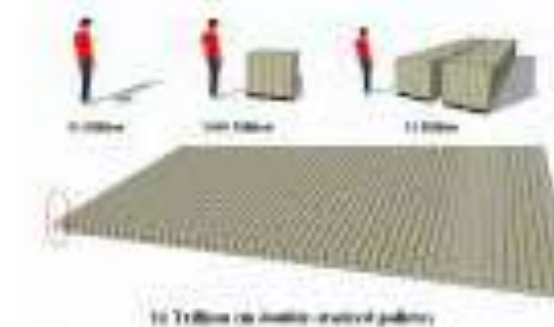


# Analisi e conservazione dei dati

I sequenziatori di tipo NGS hanno **abbattuto in maniera incredibile tempi e costi** di un sequenziamento, dato che in un solo esperimento sono in grado di **sequenziare miliardi di basi in poche ore**, pari fino a **100Gb di dati per esperimento!**

Le sequenze prodotte sono da sempre **conservate in apposite banche dati informatiche**. Prima dell'avvento di NGS, queste banche dati contavano miliardi di basi, **oggi si parla di trilioni di basi!**

UN TRILIONE DI OGGETTI  
(in questo caso dollari)



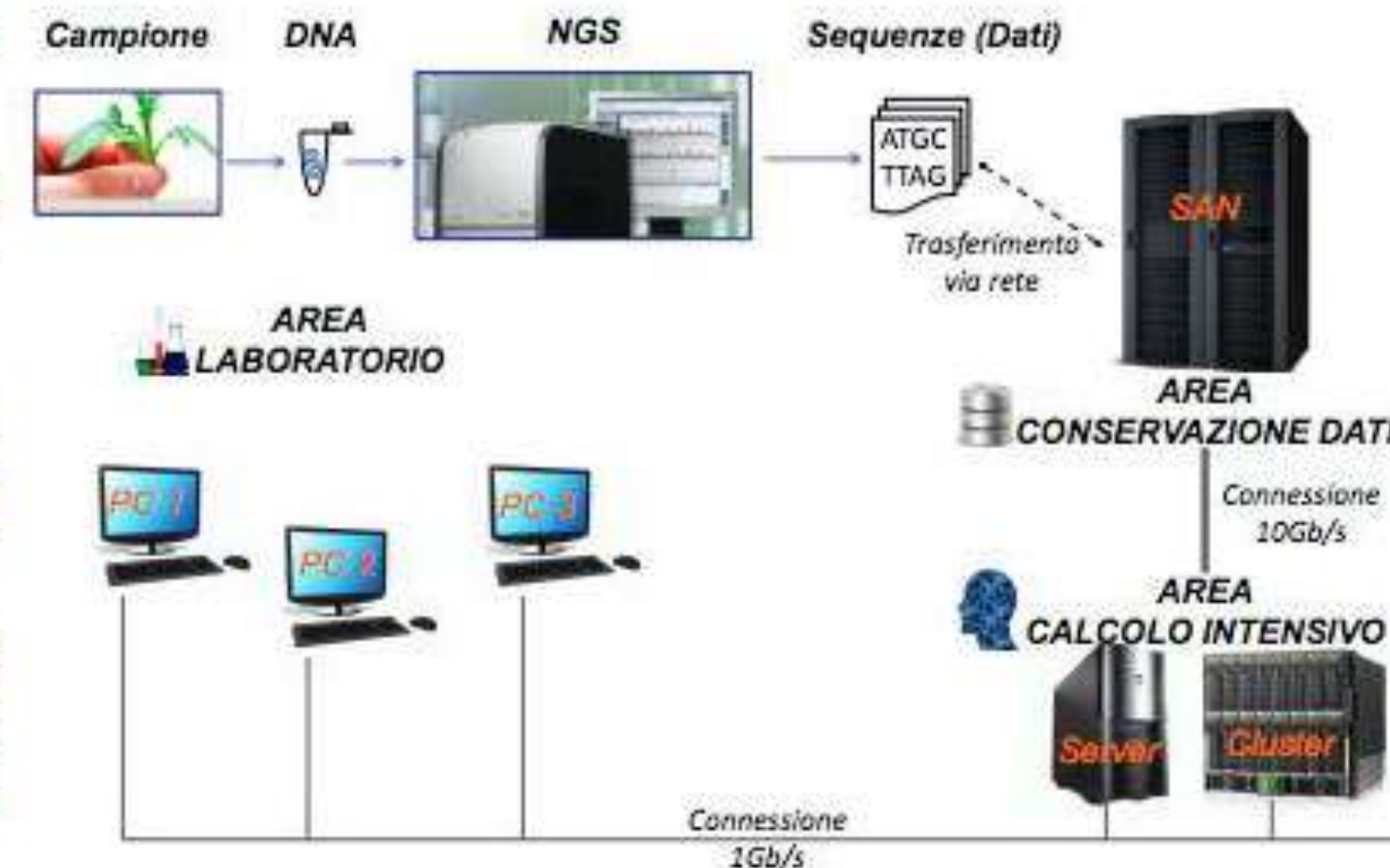
## Come si analizza il DNA una volta che è stato letto?

Una tale **mole di dati** richiede **adeguate infrastrutture informatiche** e specifici programmi per la loro analisi.

La **BIOINFORMATICA**, disciplina scientifica dedicata alla **risoluzione di problemi biologici a livello molecolare con metodi informatici**, fornisce un importante supporto al riguardo.

I laboratori più avanzati, come il nostro presso il JRC, dispongono di una **infrastruttura bioinformatica** in grado di **conservare, gestire e analizzare** la grande quantità di dati che il sequenziatore NGS produce.

Di solito una infrastruttura del genere include **server ad elevate capacità di calcolo, tanto spazio disco** per la conservazione dei dati, **cluster per il calcolo parallelo**. Sui server di calcolo e sul cluster sono installati **software bioinformatici** per l'elaborazione e l'analisi delle sequenze.







**accelerare la diagnosi**  
delle malattie genetiche

acquisire tecniche di **sequenziamento di ultima generazione** (*NGS-Next Generation Sequencing*) per:



**processare contemporaneamente** centinaia di campioni in tempi rapidi



**contenere i costi** rispetto alle analisi genetiche tradizionali



**ottenere una visione complessiva** del genoma, in particolare della sua parte codificante, l'**esoma**, dove si localizzano i geni-malattia

Ad oggi, i pannelli genomici utilizzati coprono il sequenziamento (piattaforma NGS) di numerosi geni, associati a sindromi genetiche. È disponibile anche un pannello di geni per lo studio dell'esoma clinico (4800 geni OMIM, il catalogo elettronico delle malattie e dei caratteri fenotipici ereditari nell'uomo) per la caratterizzazione di sindromi rare.



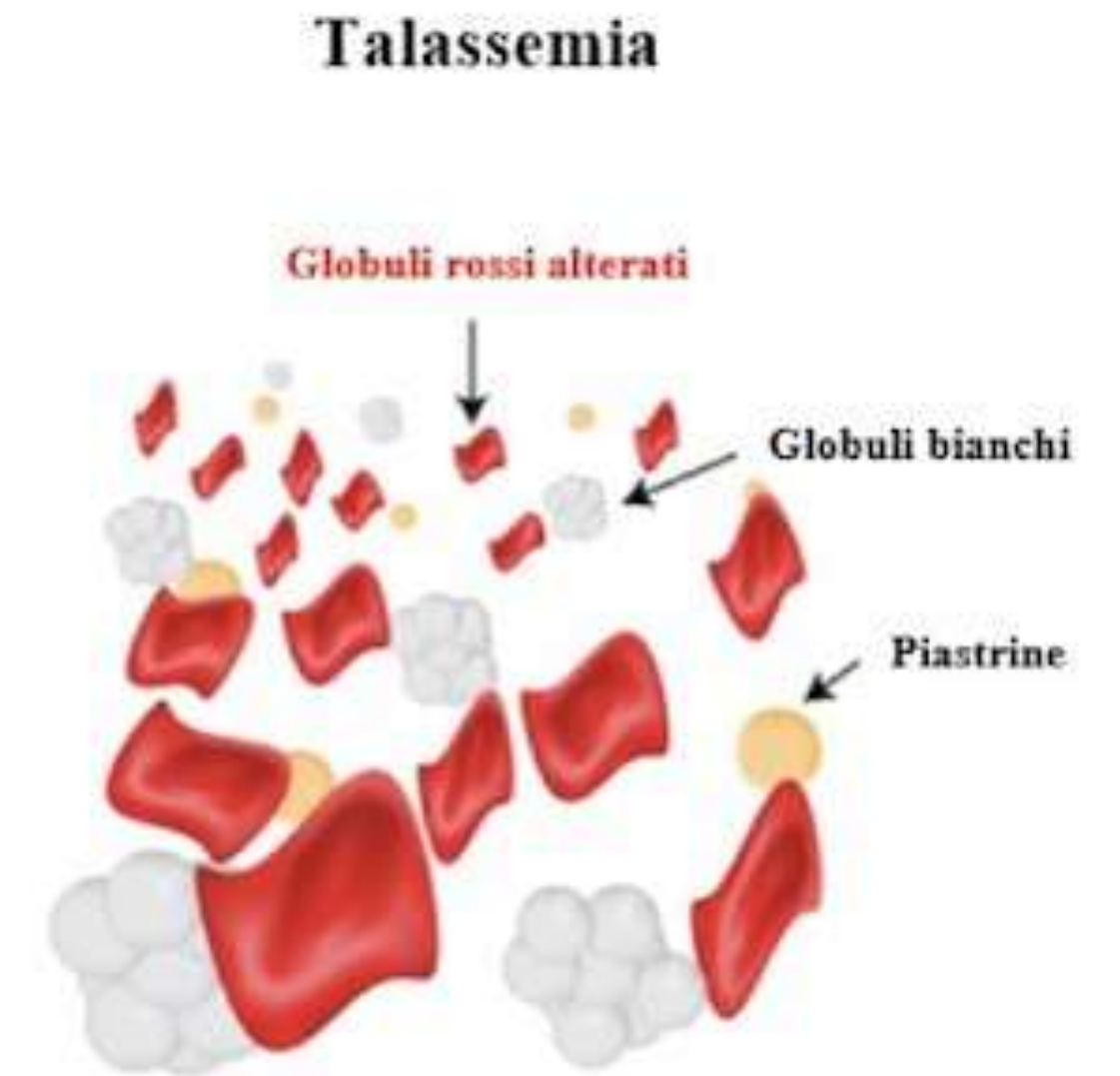
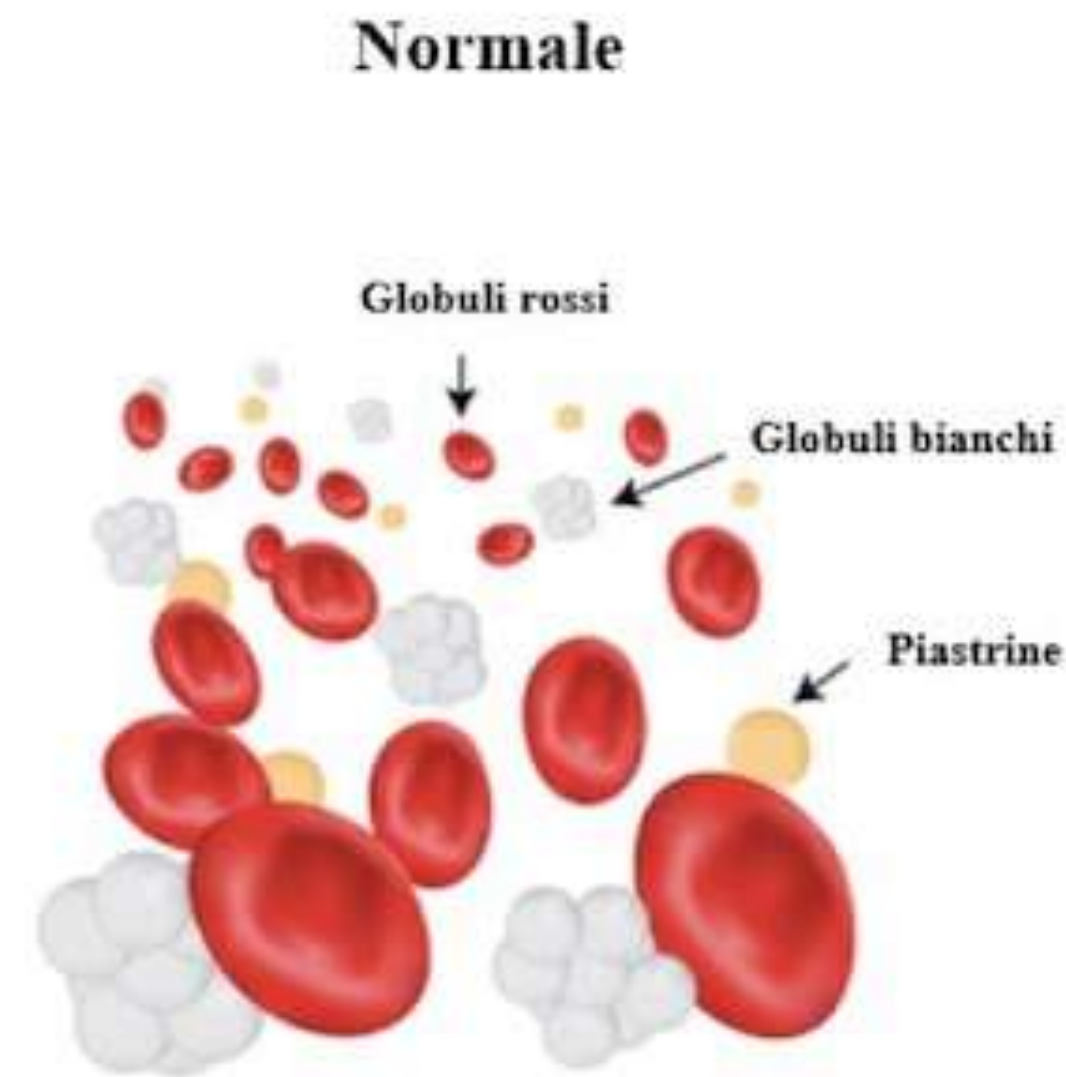
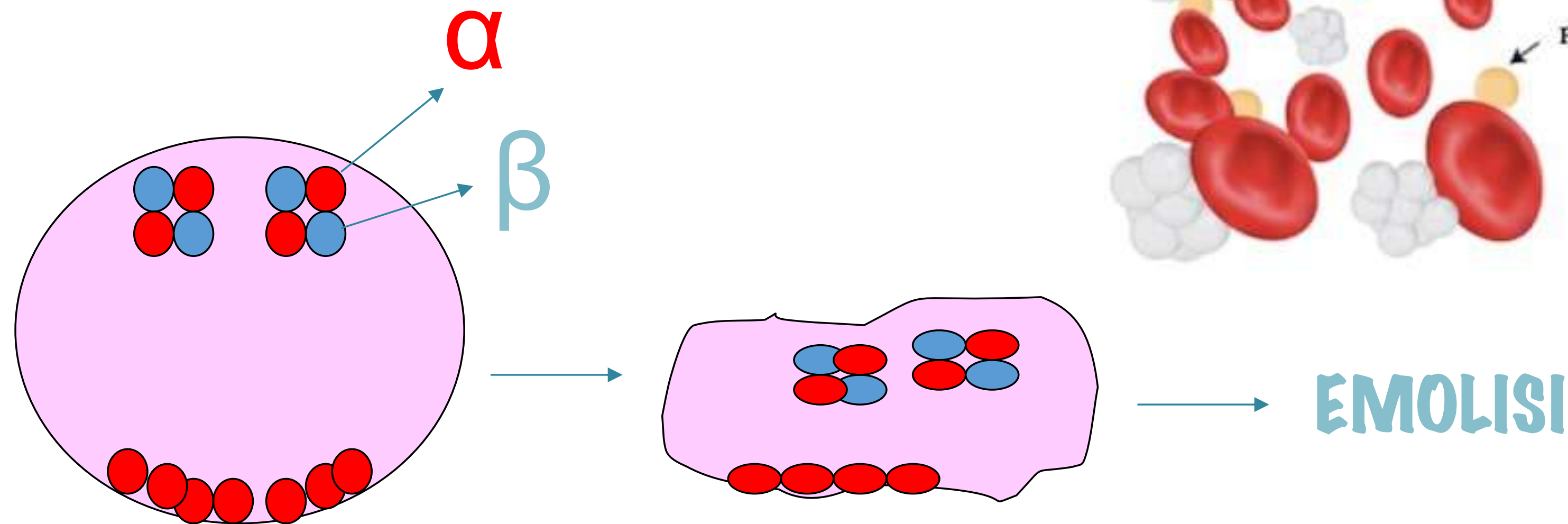
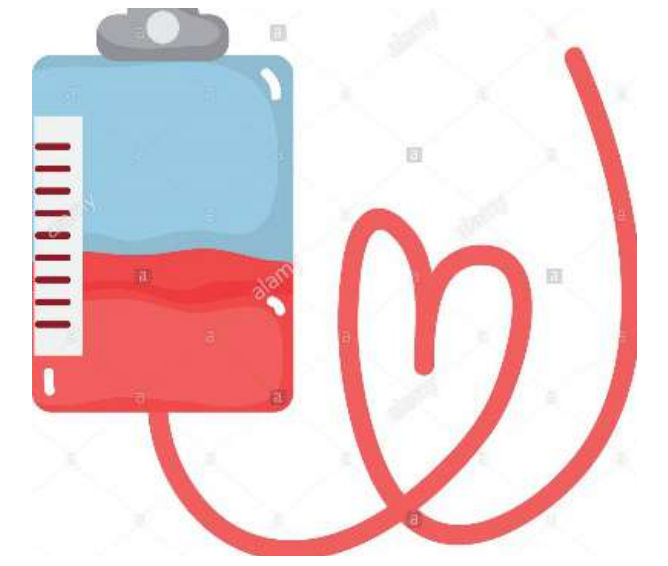


## IL GLOBULO ROSSO- L'EMOGLOBINA

E' formata da 4 catene proteiche, 2  $\alpha$  e 2  $\beta$  e da un atomo di ferro.

Nella  $\beta$ -Talassemia è ridotta o mancante la sintesi di catene  $\beta$ ,  
ciò determina:

- Minore quantità di emoglobina (Anemia)
- Globuli Rossi piccoli e deformati





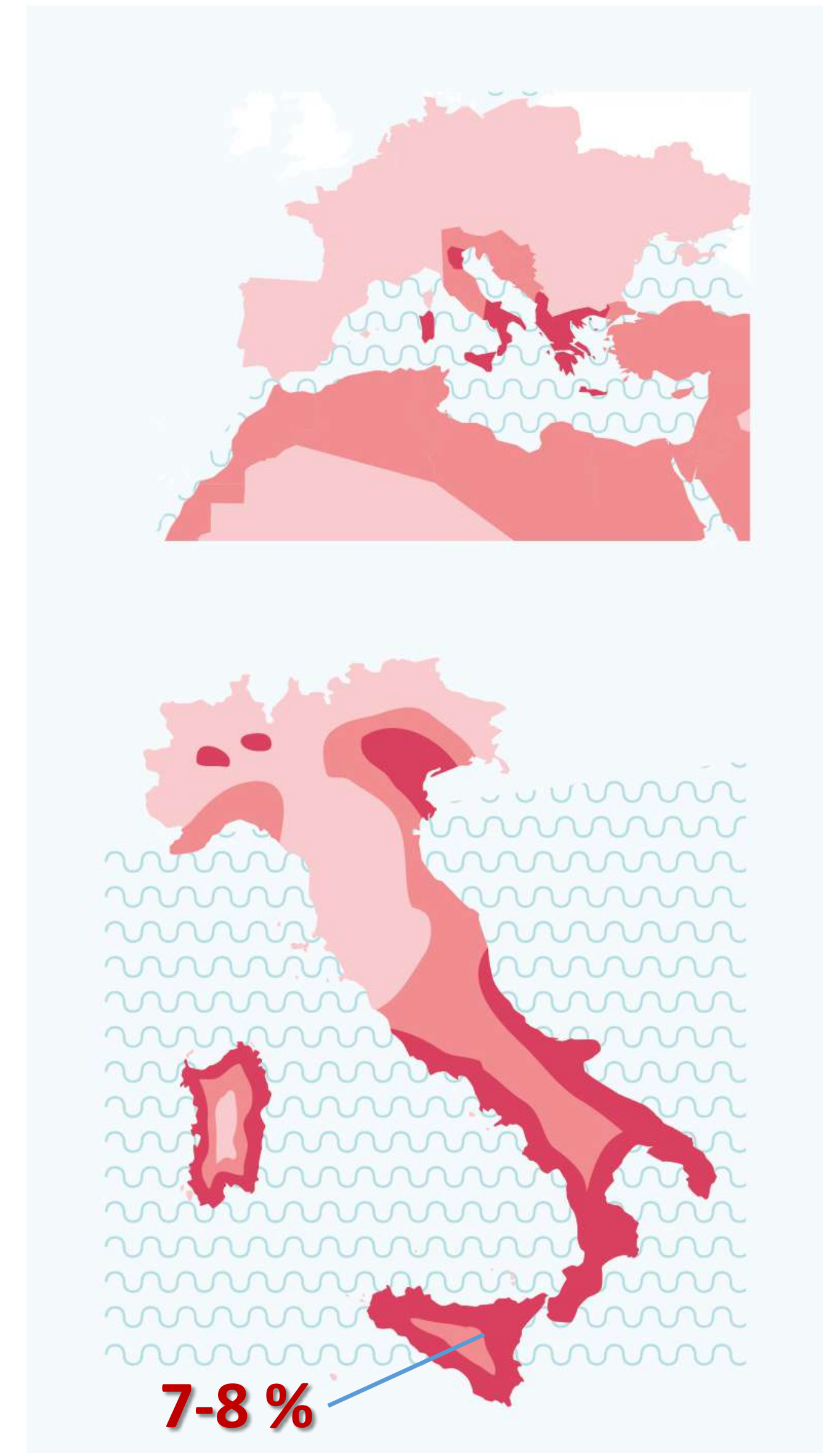
## **LA BETA TALASSEMIA O ANEMIA MEDITERRANEA**

**Ereditaria**: si trasmette dai genitori ai figli

**Autosomica**: il gene responsabile si trova sul cromosoma 11

**Recessiva**: un bambino talassemico nasce solo da due genitori portatori sani

**Endemica**: dei paesi del Mediterraneo (selezione positiva a causa della malaria)



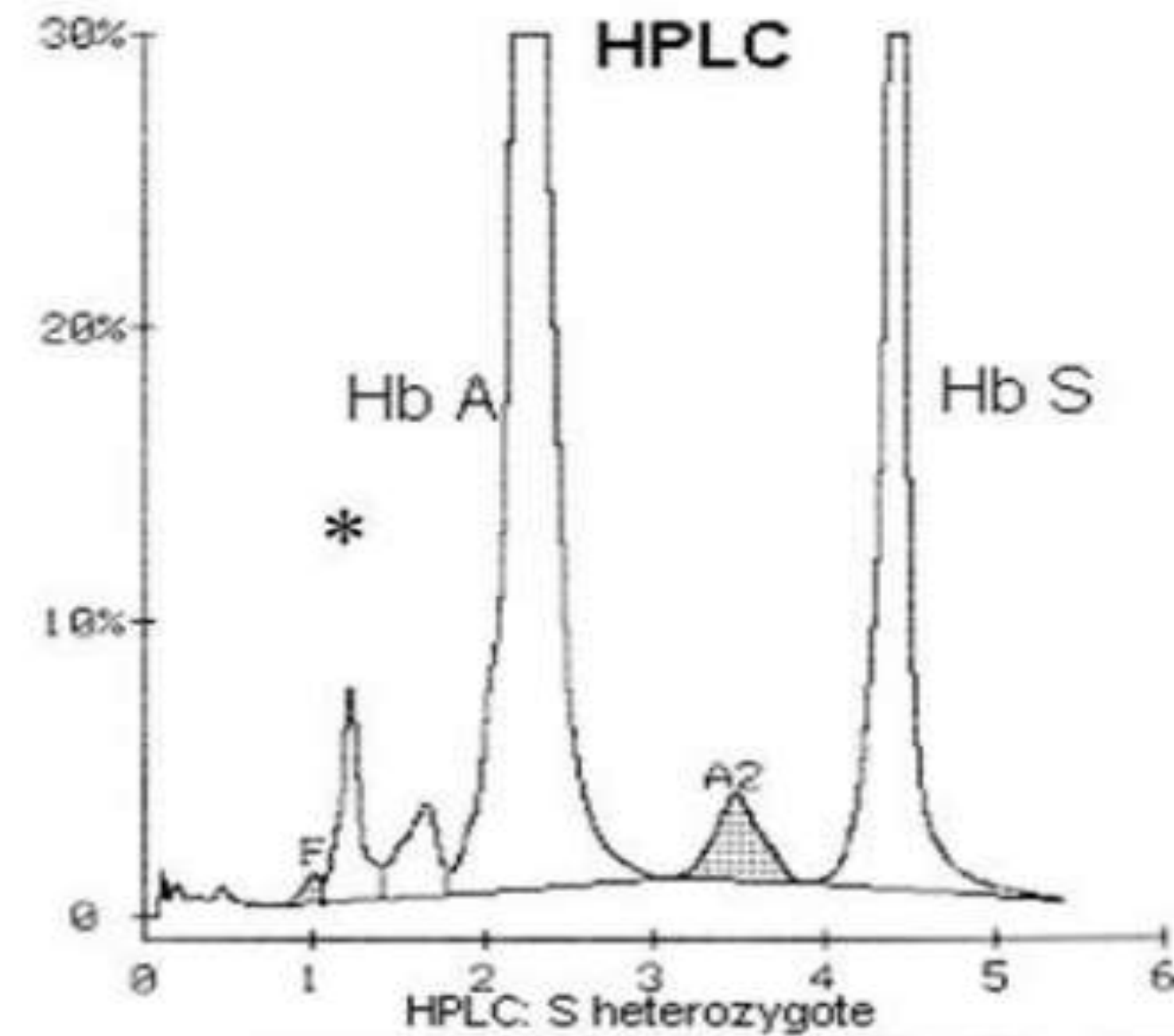


## PORTATORE SANO

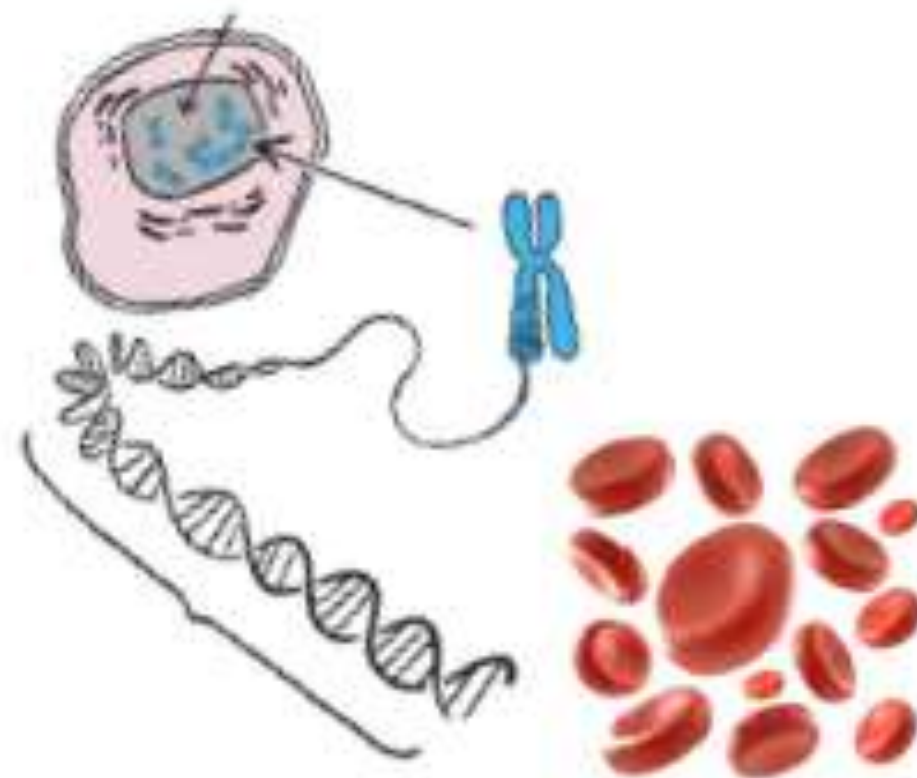
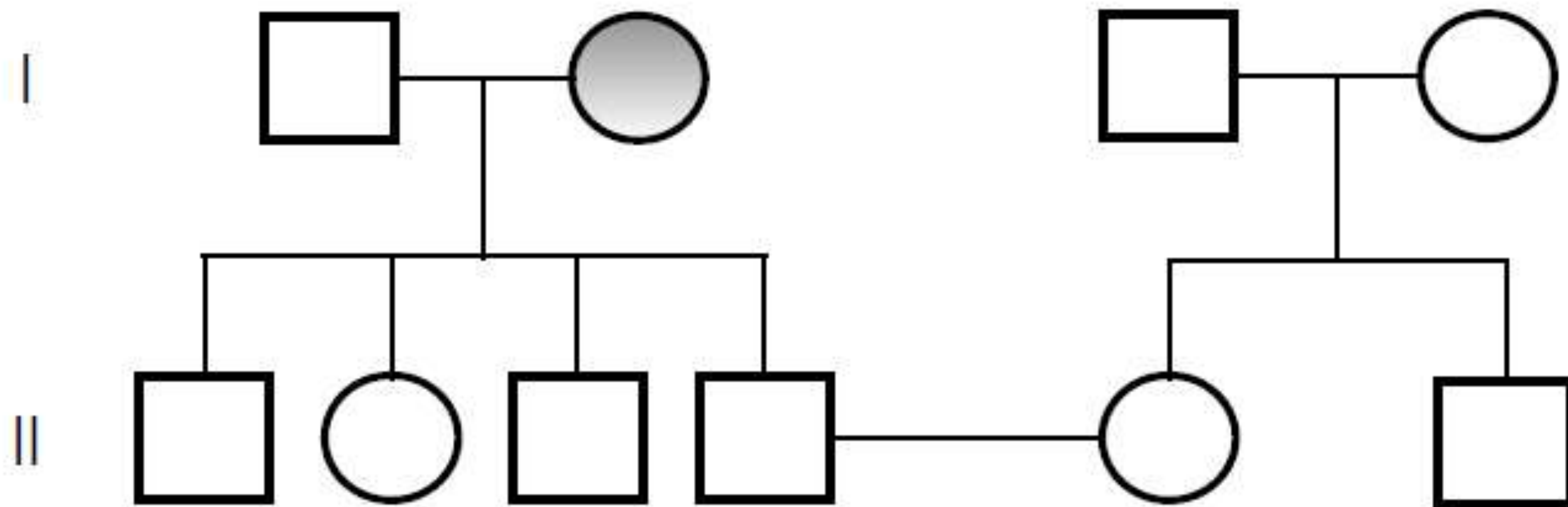
Come sapere se si è portatore sani?

<b>RBC</b>	4.50	5.00
<b>Hb</b>	<b>13.5</b>	<b>11.5</b>
<b>Hct</b>	40.0	33.5
<b>MCV</b>	<b>86.0</b>	<b>65.0</b>
<b>MCH</b>	29.0	28.5
<b>RDW</b>	13.0	14.0
<b>Hb A2</b>	<b>2,9 %</b>	<b>5,6 %</b>
	<b>Normale</b>	<b>Portatore Sano</b>

Basta un semplice prelievo di sangue!







Come da Decreto Regionale n.33 del 13 luglio 2007:  
 il test è gratuito per le donne in età compresa tra  
 14 e 50 anni, donne in gravidanza, familiari e  
 partner di soggetti portatori.



# Diagnostica della Talassemia

Test di 1° livello : HPLC+ EMOCROMO	Hb A <sub>2</sub>	<3.2	<3.2	<3.2	>3.5
	MCV	>80	<78	<78	<78
	MCH	>27	<26	<26	<27
	Ferro	normale	normale	deficit	normale

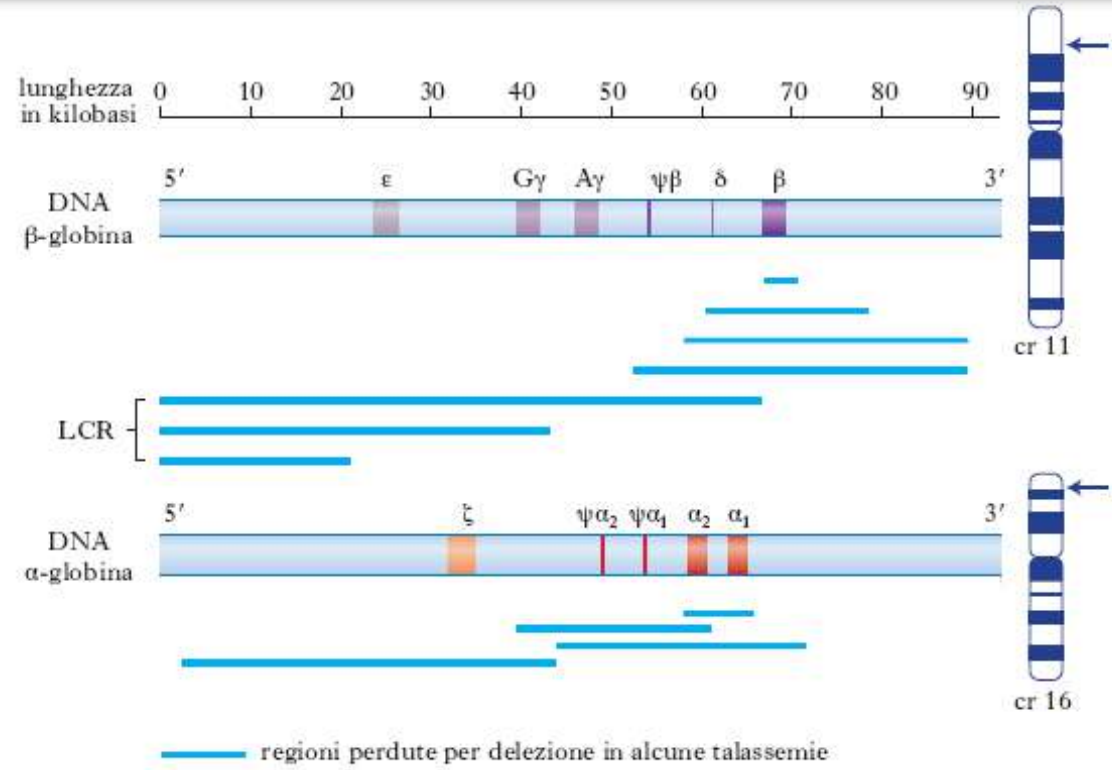
↓  
NEGATIVO

↓  
**HBA**  
o  
**HBB+ HBD**

↓  
Anemia  
ferro  
carenziale

↓  
**HBB**

## Test di 2° livello : ANALISI MOLECOLARE GENI GLOBINICI



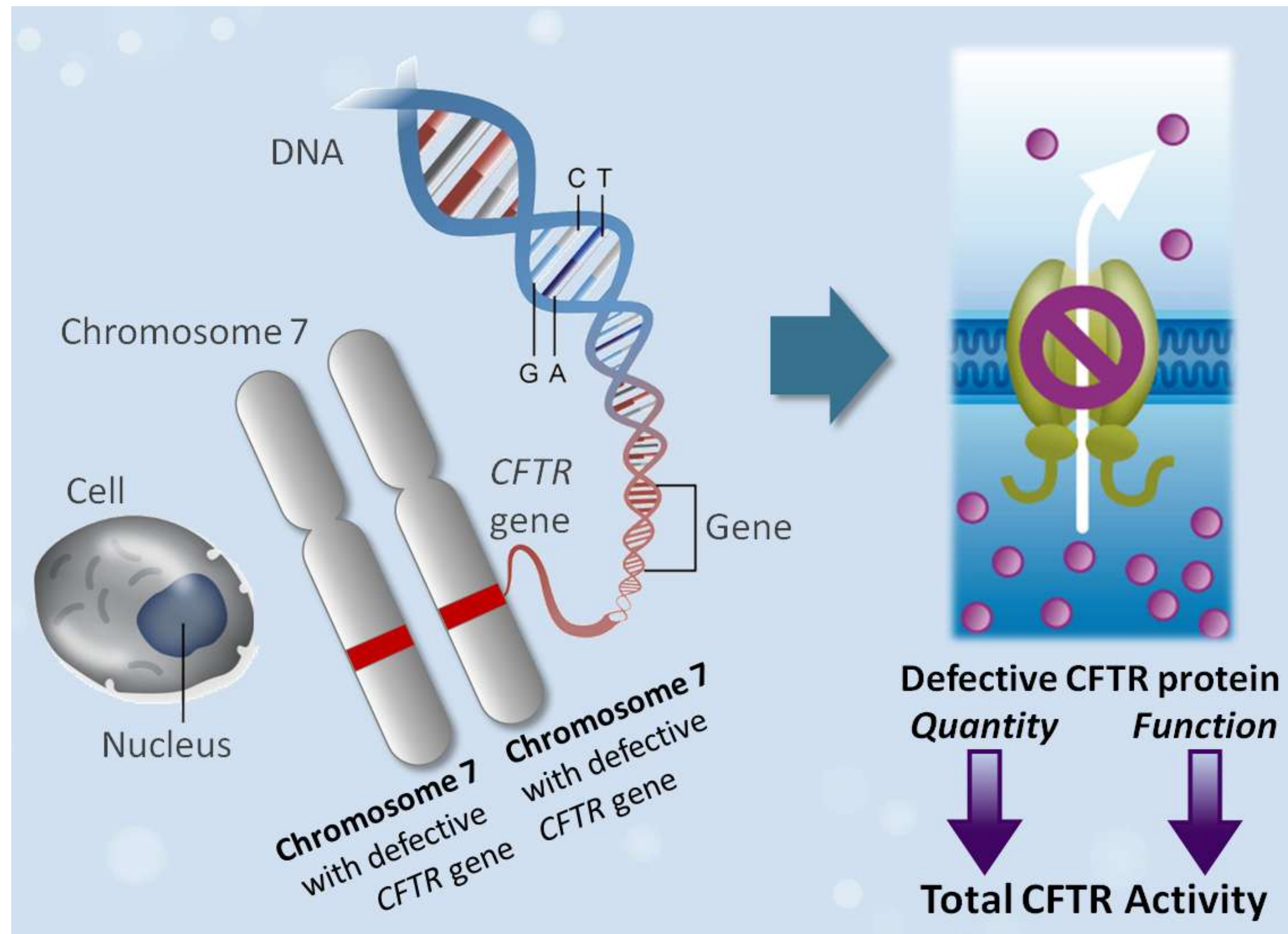
La diagnosi genetica (test 2° livello), **per identificare la coppia a rischio** di talassemia, prevede l'analisi molecolare dei geni globinici: beta (HBB), alfa (HBA) e delta (HBD).



# Eziologia della Fibrosi Cistica (FC)

Il difetto di base a livello cellulare è una disfunzione della proteina CFTR

Il gene *CFTR* codifica una proteina – la proteina-canale CFTR



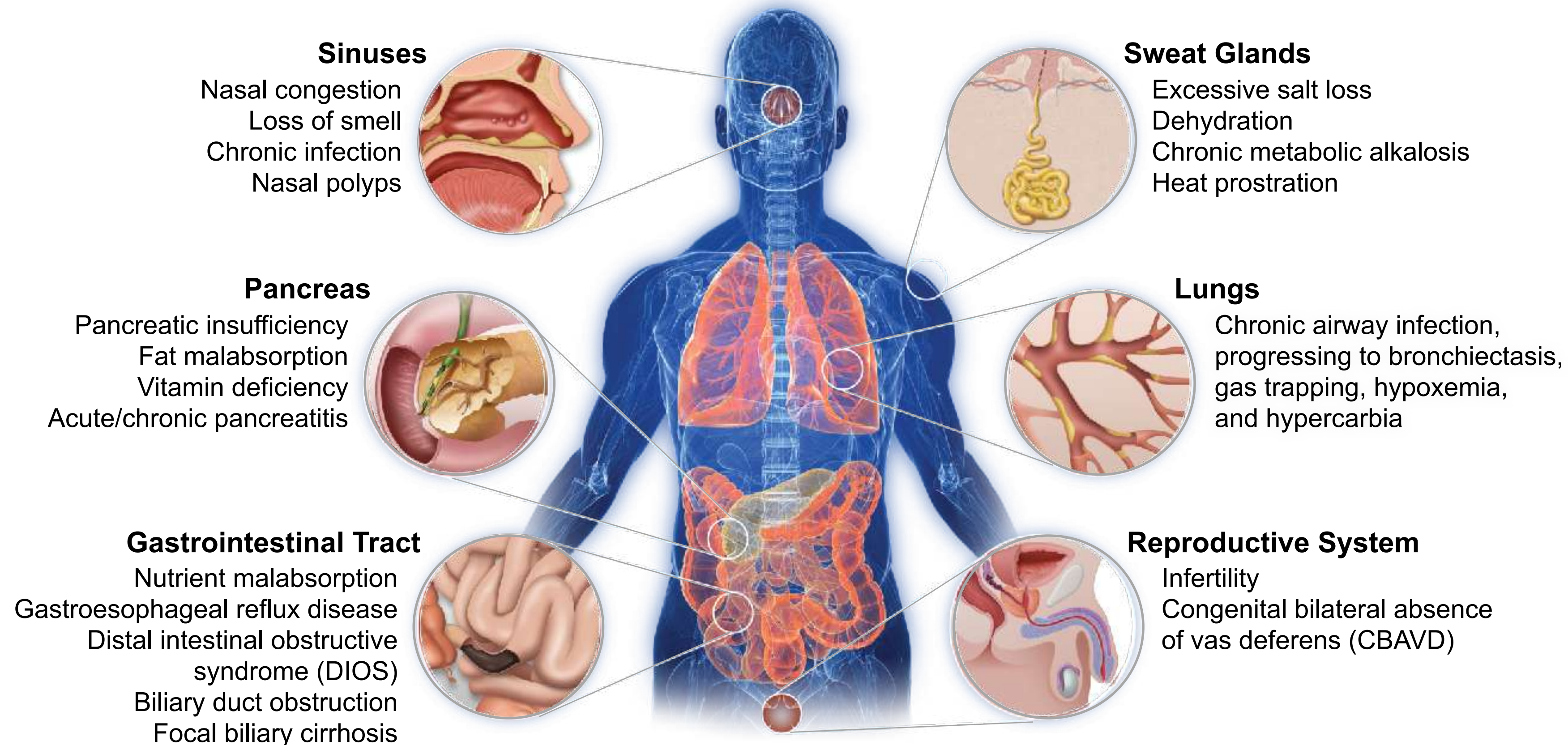
Questo risulta in anomalie nel trasporto di ioni nel polmone, pancreas, tratto intestinale, sinus, cute e sistema riproduttivo, provocando i sintomi della FC

Ad oggi più di 2.000 mutazioni identificate. Di tutte queste circa un centinaio sono le più frequenti, le altre sono rare o rarissime. Mutazioni diverse determinano una diversa gravità della malattia proprio perché diversa è l'entità del difetto che comportano nella proteina CFTR e nella sua funzione.



# La fibrosi cistica (FC) è una malattia multisistemica

Le manifestazioni multisistemiche sono dovute ad un difetto di trasporto ionico attraverso la proteina CFTR mutata



Anomalie nel trasporto di ioni nel polmone, pancreas, tratto intestinale, sinus, cute e sistema riproduttivo, provocano i sintomi della FC



Ogni bambino che nasce con occlusione intestinale viene sospettato come affetto da FC: test del sudore e test genetici eventualmente la confermano

## DIAGNOSI NEI NEONATI



Determinare su una goccia di sangue, prelevata dal tallone del neonato ed essiccata su carta da filtro, la concentrazione di cosiddetta “tripsina immunoreattiva (IRT)”: l’eccesso di tale sostanza determina il sospetto di FC; la positività del test del sudore e/o la presenza di mutazioni CFTR (analizzata sulla stessa goccia di sangue) confermano la diagnosi.





# TEST DEL SUDORE

È esame di elezione ed è quasi sempre conclusivo per la diagnosi ad ogni età

una piccola porzione della pelle dell' avambraccio viene stimolata la sudorazione con una tecnica particolare, la **iontoforesi pilocarpinica**, : si pongono degli elettrodi a contatto diretto con la cute nella zona dell'avambraccio che verrà poi coperta con una carta assorbente ed un nastro di plastica.

Dopo un certo periodo di tempo, che varia dalla mezz'ora a due ore, la carta da filtro viene rimossa e la concentrazione di sodio e cloro viene analizzata.



## Normale

$[Cl] < 40 \text{ mmol/l}$   
 $[Na] > [Cl]$

## Dubbio

$40 < [Cl] < 60$   
 $[Na] - [Cl]$  rel  
variabile

## Anormale

$[Cl] > 60 \text{ mmol/l}$   
 $[Cl] > 60 [Na]$   
Media  $[Cl]$  101.7-  
165 mmol/l

In un piccolo numero di casi però (nelle forme atipiche di FC) il test può risultare normale o a livelli intermedi. In questi casi si ricorre al genetico



Ereditaria,  
autosomica,  
recessiva,  
elevata frequenza di portatori  
(1:25)



### MUTAZIONE CFTR DF508

#### *NORMALE*

DNA	GAA	AAT	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT	TCC
PROTEINA	Glu	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Ser
POSIZIONE	504	505	506	507	508	509	510	511

#### *FIBROSI CISTICA*

DNA	GAA	AAT	ATC	AT_	_ _ T	GGT	GTT	TCC
PROTEINA	Glu	Asn	Ile	Ile	_ _ _	Gly	Val	Ser

La delezione di CTT del gene CFTR causa la perdita di una fenilalanina alla posizione 508 dei 1480 aminoacidi della proteina CFTR.

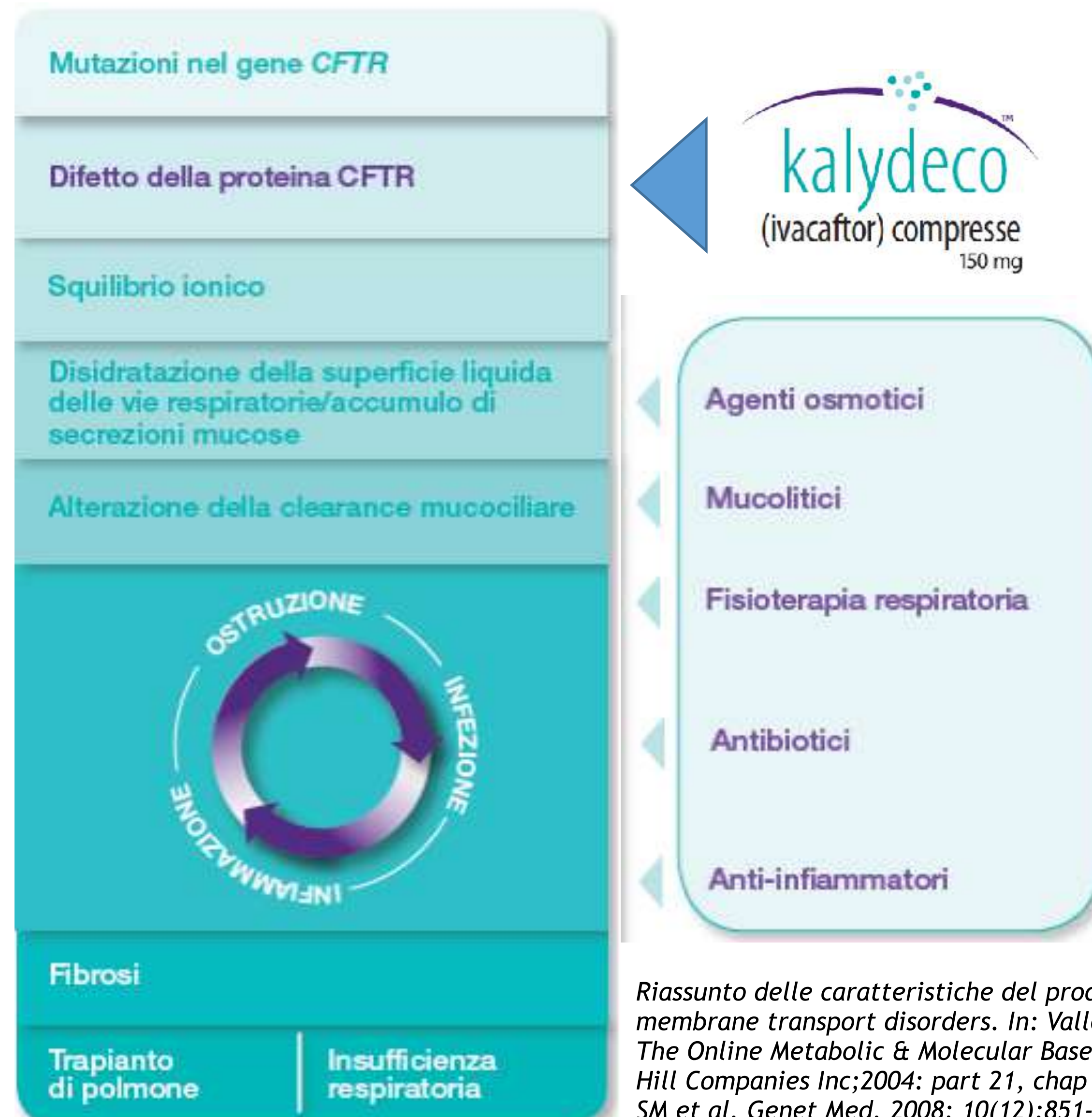
L'isoleucina (Ile) nella posizione 507 è codificata regolarmente perchè le triplette ATC e ATT codificano entrambe per isoleucina.

Comparsa per la prima volta in un'antichissima popolazione presente circa 50.000 anni fa nell'area compresa tra la Mesopotamia e il Caucaso.



# Cascata fisiopatologica della FC

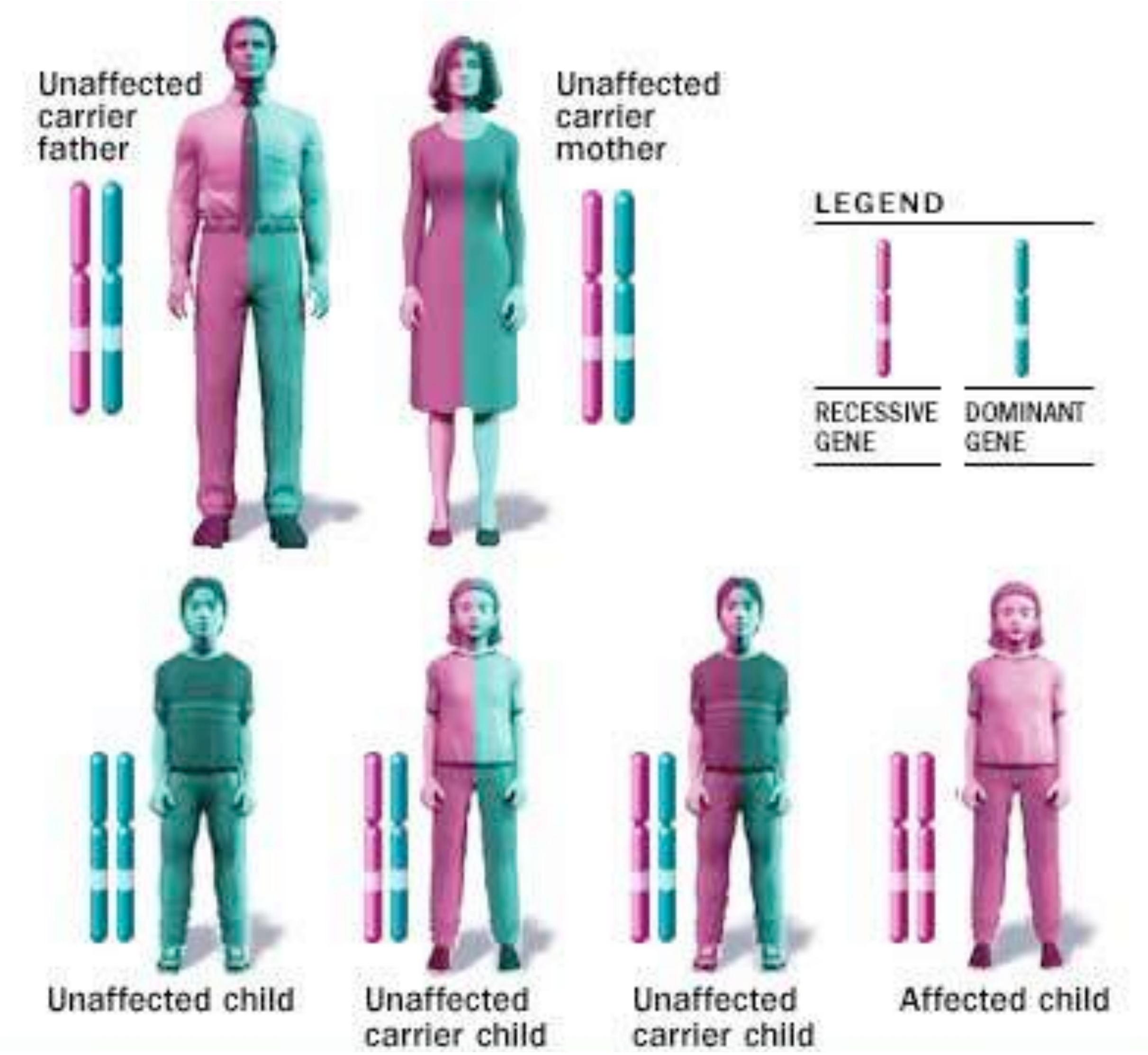
E trattamenti attualmente in uso



Riassunto delle caratteristiche del prodotto; Welsh MJ et al. Cystic fibrosis: membrane transport disorders. In: Valle D, Beaudet A, Vogelstein B et al, eds. The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. The McGraw-Hill Companies Inc;2004: part 21, chap 201. [www.ommbid.com](http://www.ommbid.com).; Moskowitz SM et al. Genet Med. 2008; 10(12):851-868.



# Patologie a trasmissione autosomica recessiva





# *Eredità mitocondriale*

- Dovuta alla trasmissione di caratteri codificati dal DNA mitocondriale
- Difetti nel DNA mitocondriale mostrano un'ereditarietà materna
- L'assenza di segregazione controllata genera ad ogni mitosi cellule con proporzioni variabili di mitocondri con DNA normale o mutante
- Caratteristiche delle malattie mitocondriali sono penetranza incompleta, espressività variabile e pleiotropia

## Esempi di Malattie mitocondriali

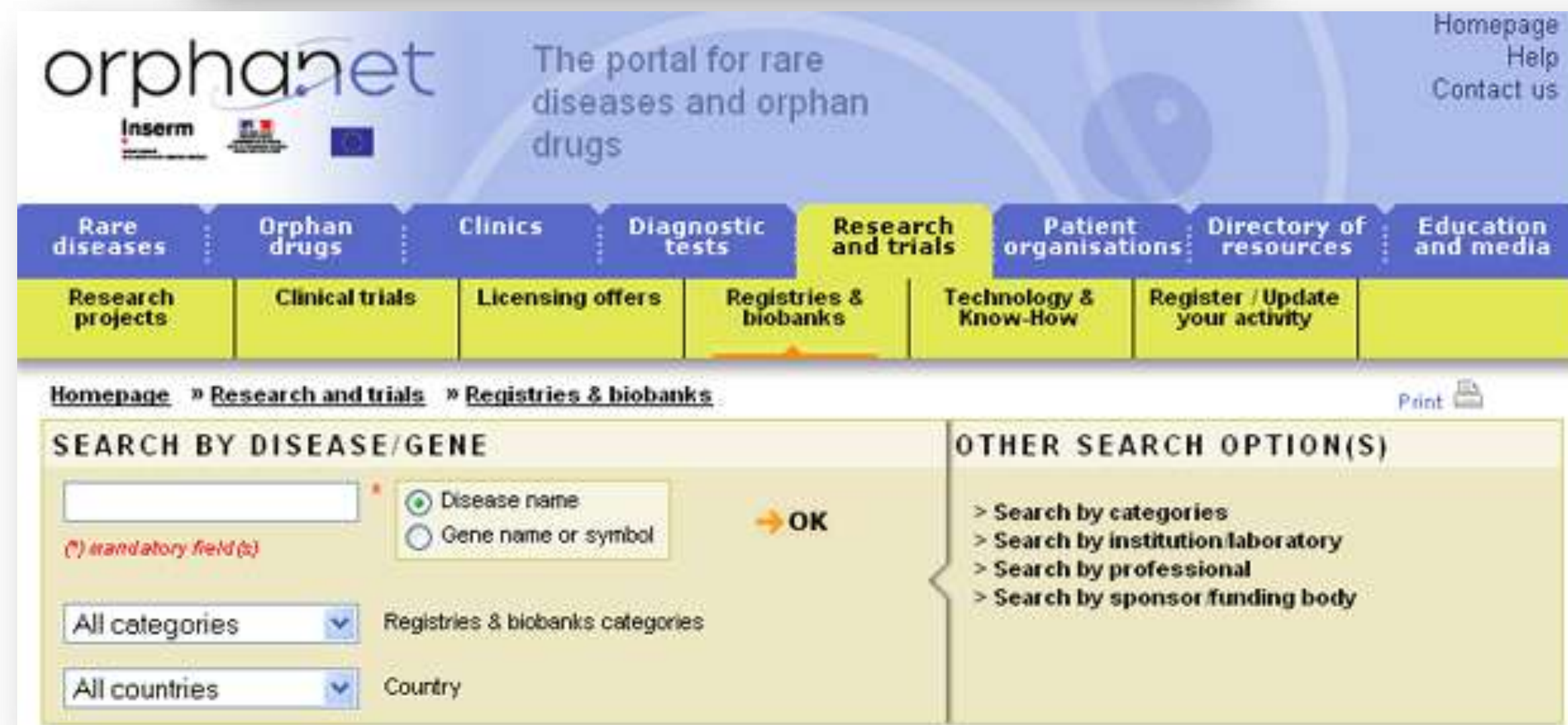
- **Sindrome di Leber:** neuropatia ottica con progressiva perdita di visione associata con aritmia cardiaca; mutazione in un componente del complesso I (subunita' ND1)
- **MELAS:** miopatia, encefalopatia, acidosi lattica, e infarto; mutazione del tRNA<sup>leu</sup> mitocondriale



# PRINCIPALI MOTORI DI RICERCA



[www.omim.org](http://www.omim.org)



[www.orpha.net](http://www.orpha.net)

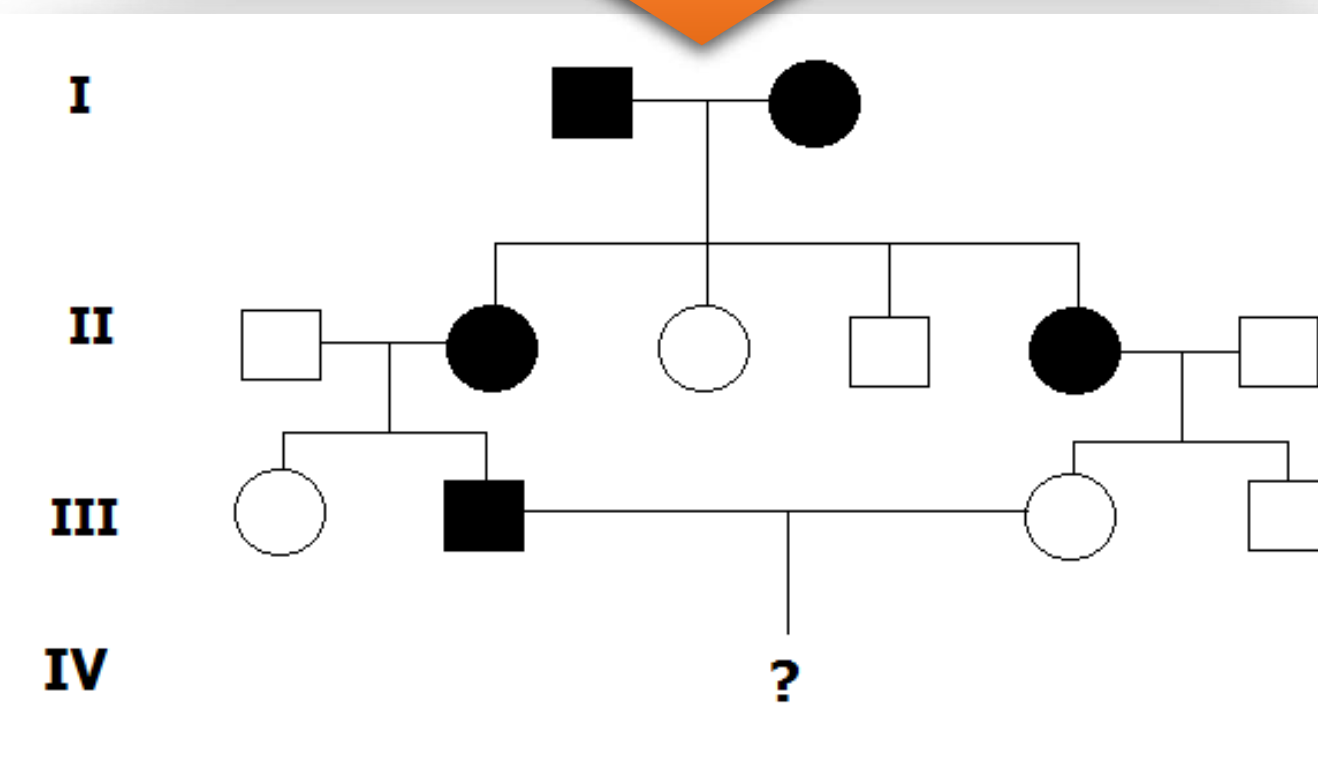




# Elementi fondamentali del test genetico

## Consulenza genetica pre-test:

- Verifica indicazione al test
- Informazione circa i limiti e utilità del test
- Raccolta del consenso informato



## Consulenza genetica post-test:

- Consegna del referto della analisi genetica
- Interpretazione del risultato e comunicazione delle conseguenze mediche del test genetico
- Supporto psicologico: aiuto a calare nel proprio vissuto la nuova informazione
- Valutazione dell'eventuale estensione dell'analisi genetica a parenti a rischio



**Analisi molecolare della regione 5' del gene FTL  
(Hyperferritinemia-cataract syndrome MIM#600886)**

**Cognome e Nome:** XXXXXX

**Sesso:** Femminile

**Data e luogo di nascita:** XXXXXX Messina

**Codice laboratorio:** XXX/17

**Data arrivo campione:** XXX

**Provenienza campione:** inviato da Dott.XXX

**Materiale biologico analizzato:** DNA genomico estratto da linfociti di sangue periferico

**Indicazione all'esame:** soggetto con iperferritinemia e cataratta bilaterale

**Metodi utilizzati:** sequenziamento diretto (sequenziatore automatico ABI PRISM 3130)

**Dati anamnestici**

**Metodica:  
Limiti e utilità**

**Regioni geniche indagate:** Regione regolatoria denominata IRE (elemento responsivo al ferro) nella porzione 5' non codificante del gene della catena leggera della ferritina (FTL; 134790)

**Frammento amplificato:** 649 bp

**Sensibilità e specificità analitica dell'esame:** > 99%

**Efficienza diagnostica dell'esame:** > 99%

**Risultati:** Eterozigote per la mutazione 32 (G→C) (c.-168G > C)

**Conclusioni:** La mutazione identificata è associata alla Sindrome da Iperferritinemia e Cataratta congenita.

Per confermare lo stato di eterozigote, tuttavia, è necessario estendere l'esame ai genitori. In caso di conferma della mutazione identificata si sottolinea che i genitori hanno un rischio di concepire un figlio affetto pari al 50%. Poiché si tratta di una malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante si consiglia di estendere l'analisi genetica ai familiari e la consulenza genetica.

*Hyperferritinaemia-cataract syndrome: Worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder.* Gunda Millonig, Martina U Muckenthaler and Sebastian Mueller. *Human Genomics* 2010, 4:250-262



# www.HGVS.org/varnomen

Sequence Variant Nomenclature

Recent Additions

An overview of recent additions, especially those that led to a change of the HGVS version number, can be found on the [versioning page](#). The [Open Issues](#) page shows whether there are proposals open for Community Consultation and which topics are currently under discussion (pre-proposal).

**Follow the recommendations**  
*when you disagree, start a debate -do not use private rules, this only causes confusion*



## Current Recommendations

General	DNA	RNA
Protein	Uncertain	Checklist
Open Issues		

## Background Material

Basics	Reference Sequences	Standards
Numbering	Community Consultation	HGVS Simple
Educational Material	Glossary	



# Substitution

- substitution designated by ">"  
*> not used on protein level*

- examples

<i>genomic</i>	<i>g.54786A&gt;T</i>
<i>cDNA</i>	<i>c.545A&gt;T</i> ( <i>NM_012654.3 : c.546A&gt;T</i> )

<i>RNA</i>	<i>r.545a&gt;u</i>
------------	--------------------

<i>protein</i>	<i>p.(Gln182Leu)</i>
----------------	----------------------

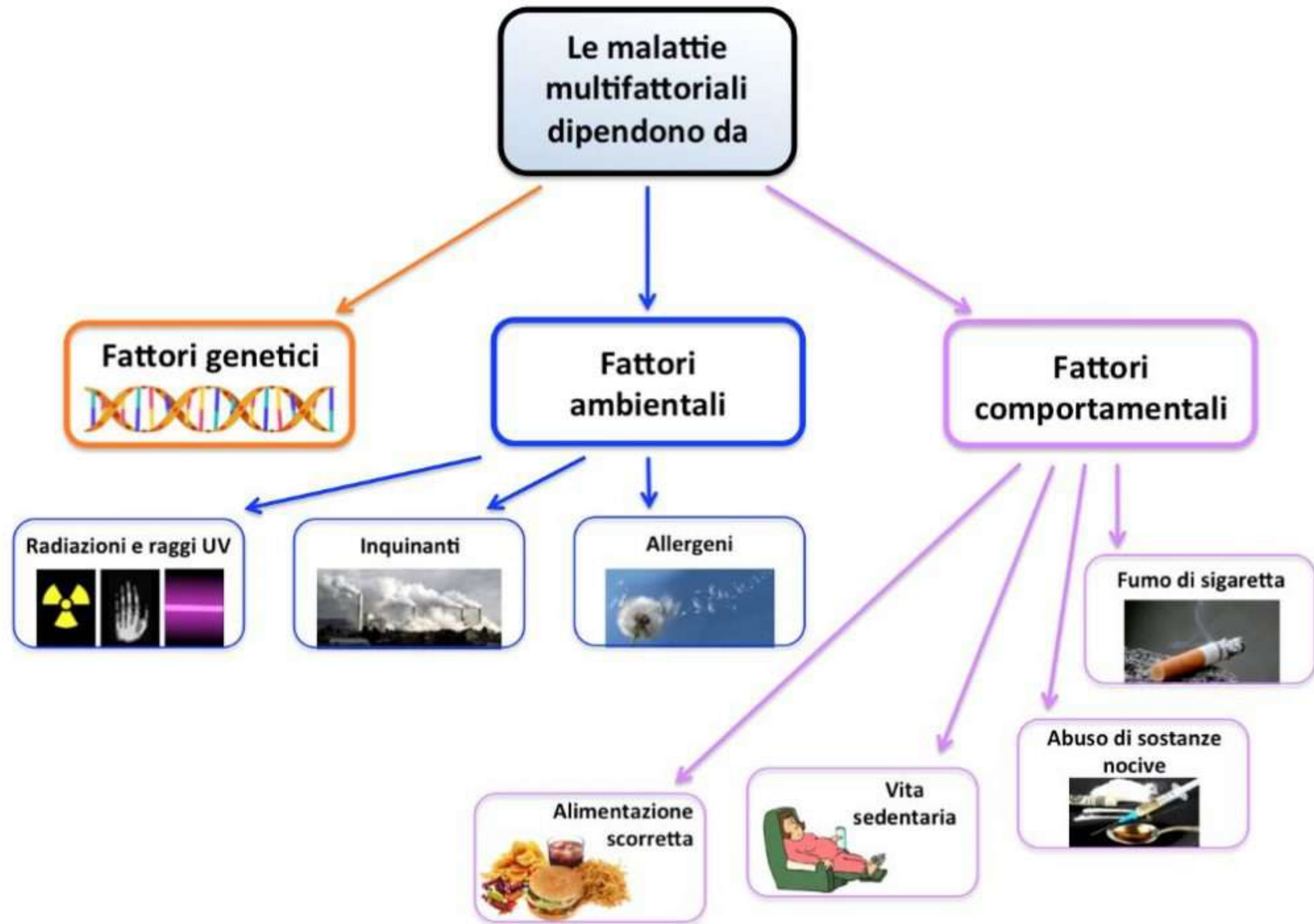


# Alleles

- **allele**  
*indicated by "[ ]", separated by ";"*
- **2 changes, 2 alleles**  
*c. [428A>G] ; [83dupG]*
- **1 allele, several changes**  
*c. [12C>G ; 428A>G ; 983dupG]*
- **2 changes, allele unknown**  
*c. 428A>G (;) 83dupG*
- **special cases**
  - mosaicism*  
*c. 428A= / A>G*
  - chimerism*  
*c. 428A= // A>G*

*spaces in  
description used  
for clarity only*

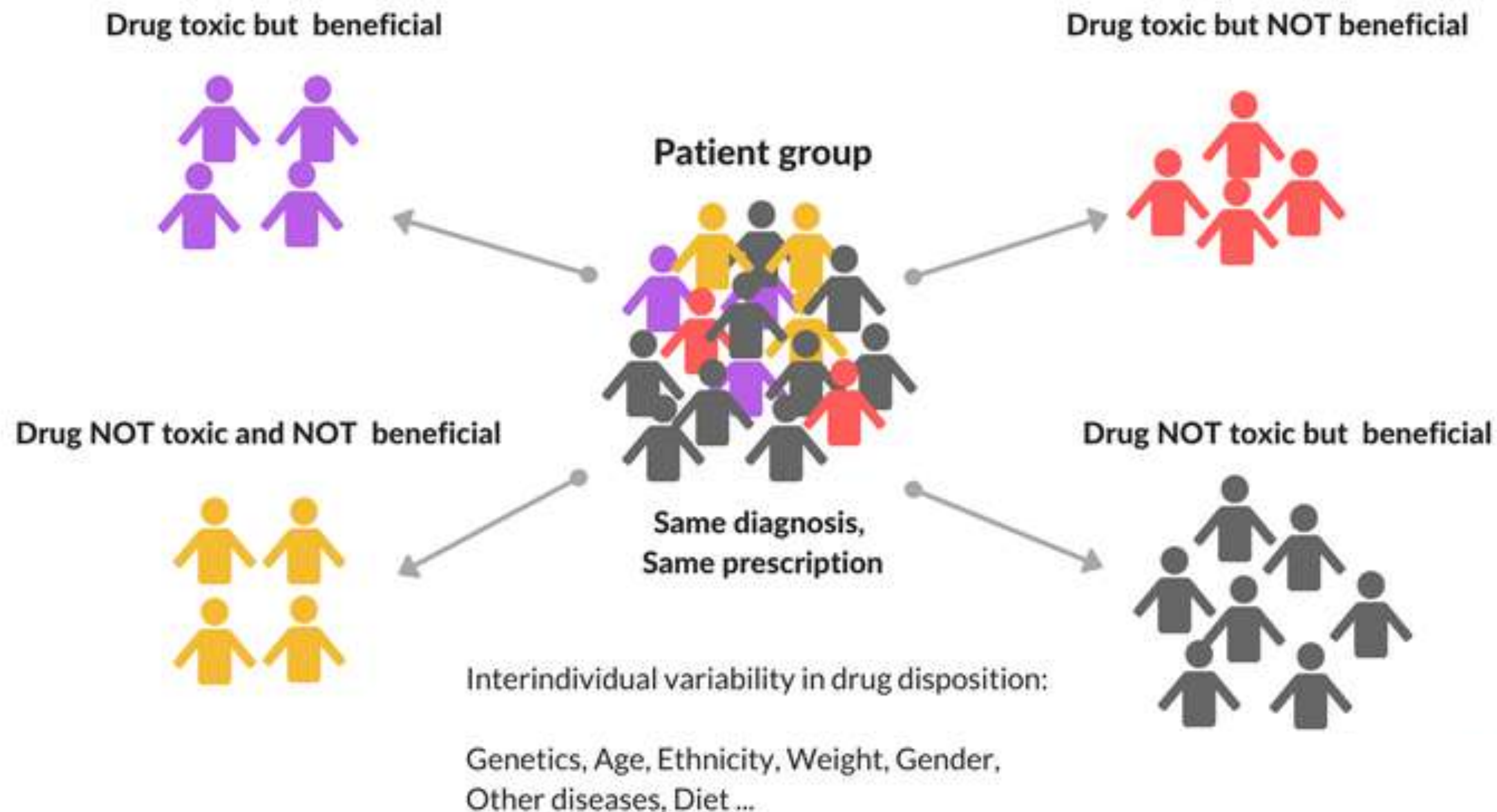




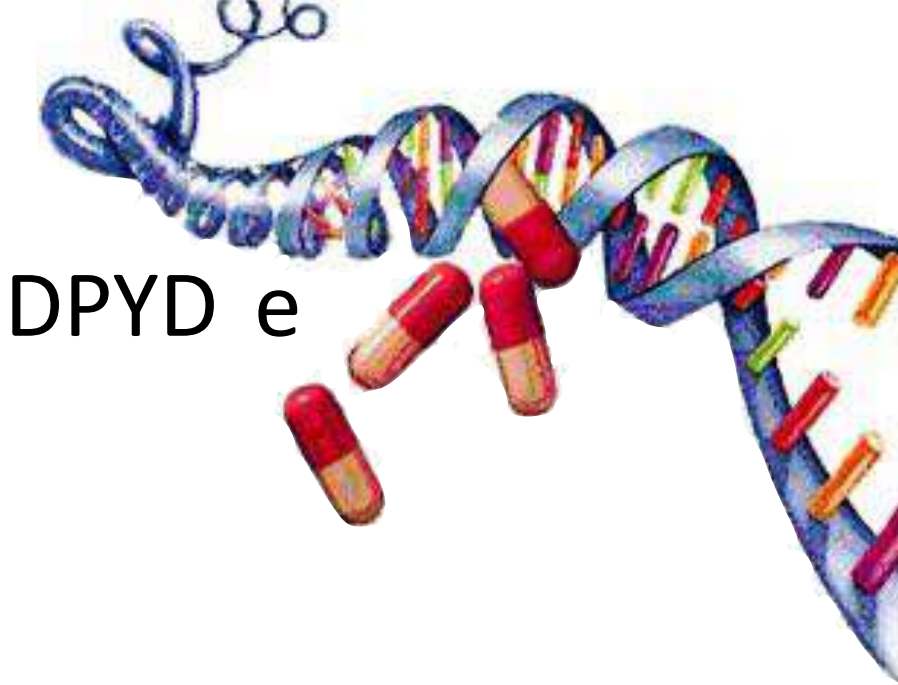


# FARMACOGENETICA e FARMACOGENOMICA

Problematica clinica della variabilità interindividuale nella risposta ai farmaci : somministrando **lo stesso farmaco** a diversi pazienti, si possono avere **diverse risposte**: effetto terapeutico, nessun effetto, tossicità.







Nel 2015 il gruppo di lavoro AIOM-SIF ha redatto le linee-guida per l'analisi farmacogenetica dei geni DPYD e UGT1A1.

Nel documento l'analisi molecolare delle varianti dei due geni viene raccomandata:

1. In pre-terapia con fluoropirimidine o irinotecano rispettivamente, ogni qualvolta, a giudizio dell'oncologo, il trattamento venga proposto per un paziente in cui, per le caratteristiche cliniche (comorbidità, PS, stato di malattia) il vantaggio terapeutico in termini di sopravvivenza e/o risposta possa ipotizzarsi di limitato impatto e/o sia elevato il rapporto rischio/beneficio.
2. Durante la terapia nei pazienti che abbiano manifestato tossicità.

Per quanto riguarda il DPYD, sia le linee-guida di AIOM-SIF sia quelle del Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) raccomandano di analizzare le seguenti varianti: DPYD\*2A (IVS14+1G>A, c.1905+1G>A, rs3918290), DPYD\*13 (c.1679T>G, rs55886062) e DPYD c.2846A>T (rs67376798).

Tali varianti sono chiamate non-funzionali in quanto portano ad una ridotta o nulla attività della diidropirimidina deidrogenasi (DPD), il principale enzima responsabile del catabolismo del fluorouracile. Pertanto i pazienti oncologici che presentano l'allele mutato di queste varianti rischiano di incorrere in una severa, a volte letale, tossicità se trattati con fluoropirimidine (5-Fluorouracile, capecitabina, tegafur).

Nelle stesse linee-guida si raccomanda di scegliere una terapia alternativa per i pazienti con genotipi omozigoti DPYD c.1905+1AA, c.1679GG e c.2846TT (attività DPD nulla) e di ridurre il dosaggio di fluoropirimidine del 50% nei pazienti con genotipi eterozigoti DPYD c.1905+1GA, c.1679TG e c.2846AT (attività DPD ridotta).





Per quanto riguarda l'UGT1A1, sia AIOM-SIF, sia un gruppo di lavoro francese comprendente il National Pharmacogenetics Network (RNPGx) e il Group of Clinical Onco-pharmacology (GPCO-Unicancer), sia il Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) raccomandano nelle proprie linee-guida di analizzare il polimorfismo genico UGT1A1\*28 (rs8175347), che consiste nella variabilità del numero di ripetizioni (comunemente 6 o 7 nella popolazione Caucasica) del microsatellite TA nel promotore del gene.

L'irinotecano è un profarmaco che viene convertito in vivo nel suo metabolita attivo SN-38. La conseguente trasformazione di SN-38 nel suo derivato inattivo avviene per coniugazione del farmaco con una molecola di acido glucuronico operata da enzimi appartenenti alla famiglia delle uridino-glucuronosiltransferasi 1A (UGT1A) e principalmente dalla isoforma UGT1A1.

La variante UGT1A1\*28 [(TA)<sub>7</sub>TAA] determina una ridotta attività enzimatica della UGT1A1 con conseguente grave tossicità gastrointestinale ed ematologica nei pazienti trattati con irinotecano.

Pertanto nelle stesse linee-guida si raccomanda anche di ridurre il dosaggio di irinotecano nei pazienti con genotipo omozigote mutato UGT1A1\*28/\*28 [(TA)<sub>7/7</sub>TAA].



## Le mutazioni somatiche



Si verificano nel periodo post-zigotico: embrionale o post-natale

- le cellule del midollo osseo, per caratterizzare il corredo cromosomico nelle leucemie
- le cellule tumorali, per caratterizzare le neoplasie

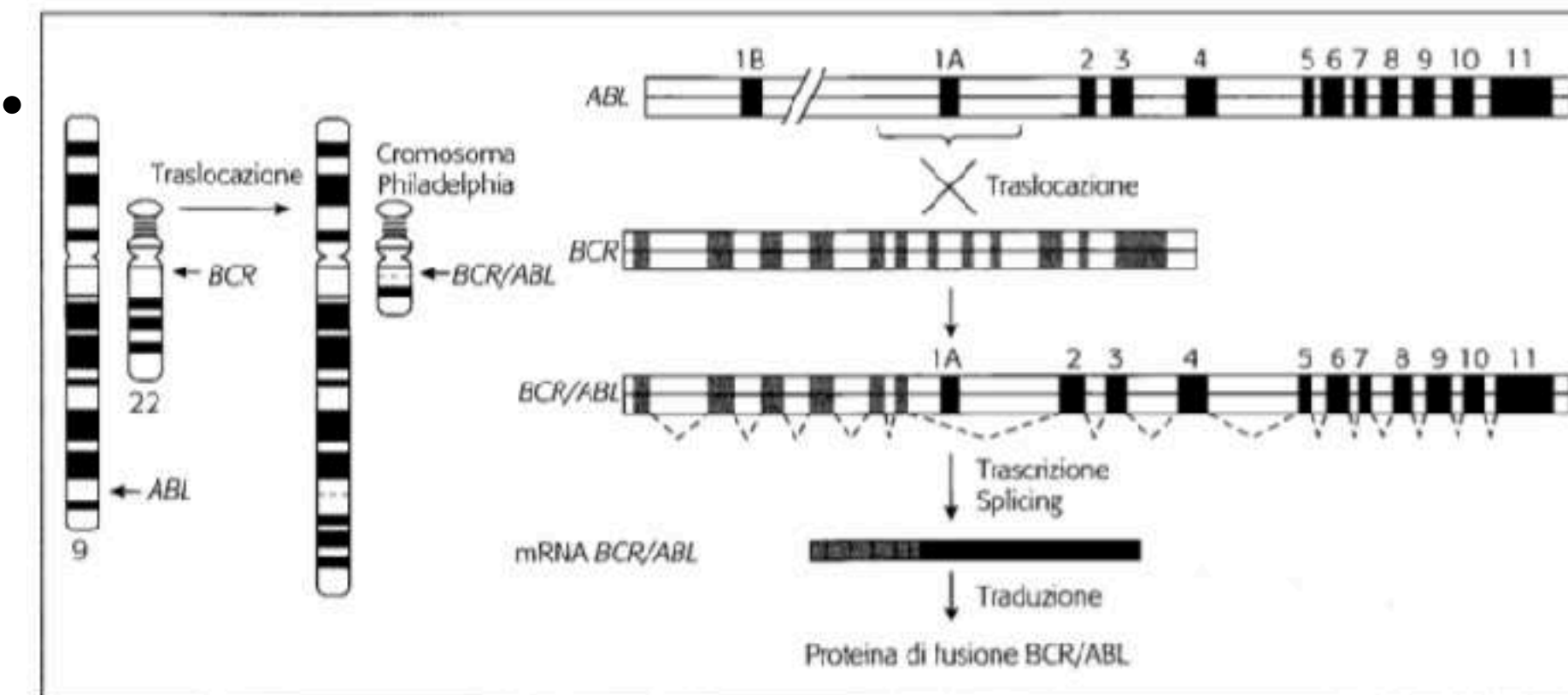
La cellula tumorale ha un corredo cromosomico anomalo.

**Cromosoma Filadelfia – leucemia mieloide cronica  
(traslocazione 22;9)**

I cambiamenti cromosomici rappresentano un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione del tumore.

Controllo genetico della crescita tumorale

Onco-geni – onco-soppressori





# Il biologo nel lab. di P.M.A.

1978





## Laboratorio PMA

### **Organizzazione Strutturale:**

- **LAB. SEMINOLOGIA:** Analisi e Trattamento del Liquido Seminale
- **LAB. ANDROLOGIA:** Trattamento Agoaspirato Testicolare e Biopsia Testicolare
- **LAB. EMBRIOLOGIA:** Prelievo ed Inseminazione Ovociti - Coltura embrioni - ET
- **LAB. CRIOBIOLOGIA:** Crioconservazione Spermatozoi, Ovociti ed Embrioni
- **CRIOBANCA:** Locale Stoccaggio Spermatozoi, Ovociti ed Embrioni in N2L



## ESAME MICROSCOPICO

Il vetrino portaoggetti viene analizzato al Microscopio ottico (10X, 20X, 40X) per valutare:

➤ **CINETICA SPERMATOZOI:**

Motilità Totale (%), Progressiva (%), Non Progressiva (%), Immobili (%)

➤ **QUANTITÀ degli SPERMATOZOI PRESENTI al fine di stabilire la DILUIZIONE PER LA CONTA**

➤ **COMPONENTE NON NEMASPERMICA:**

- Leucociti
- Emazie
- Zone di agglutinazione
- Cellule epiteliali
- Cristalli
- Cellule spermatogenesi

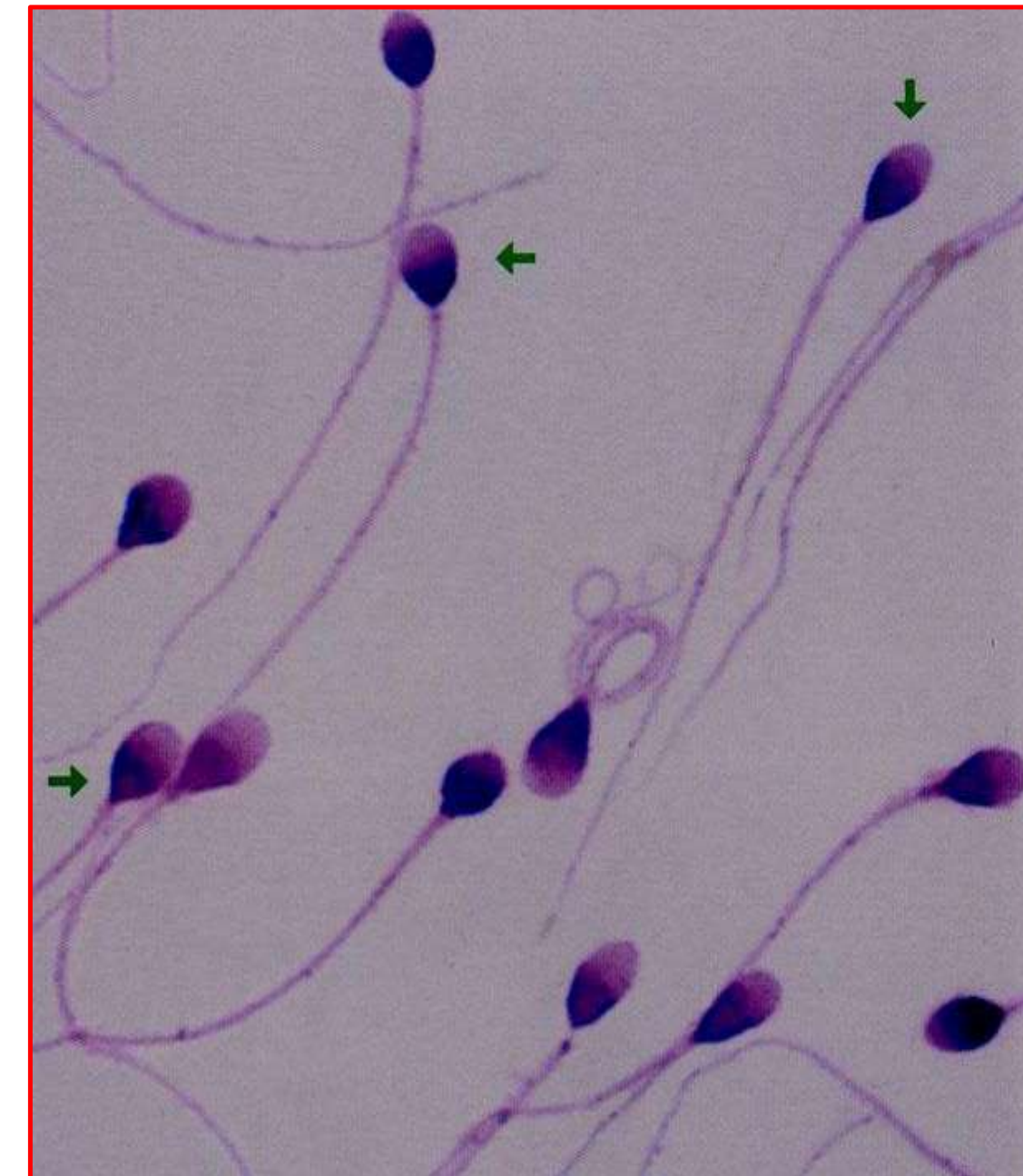
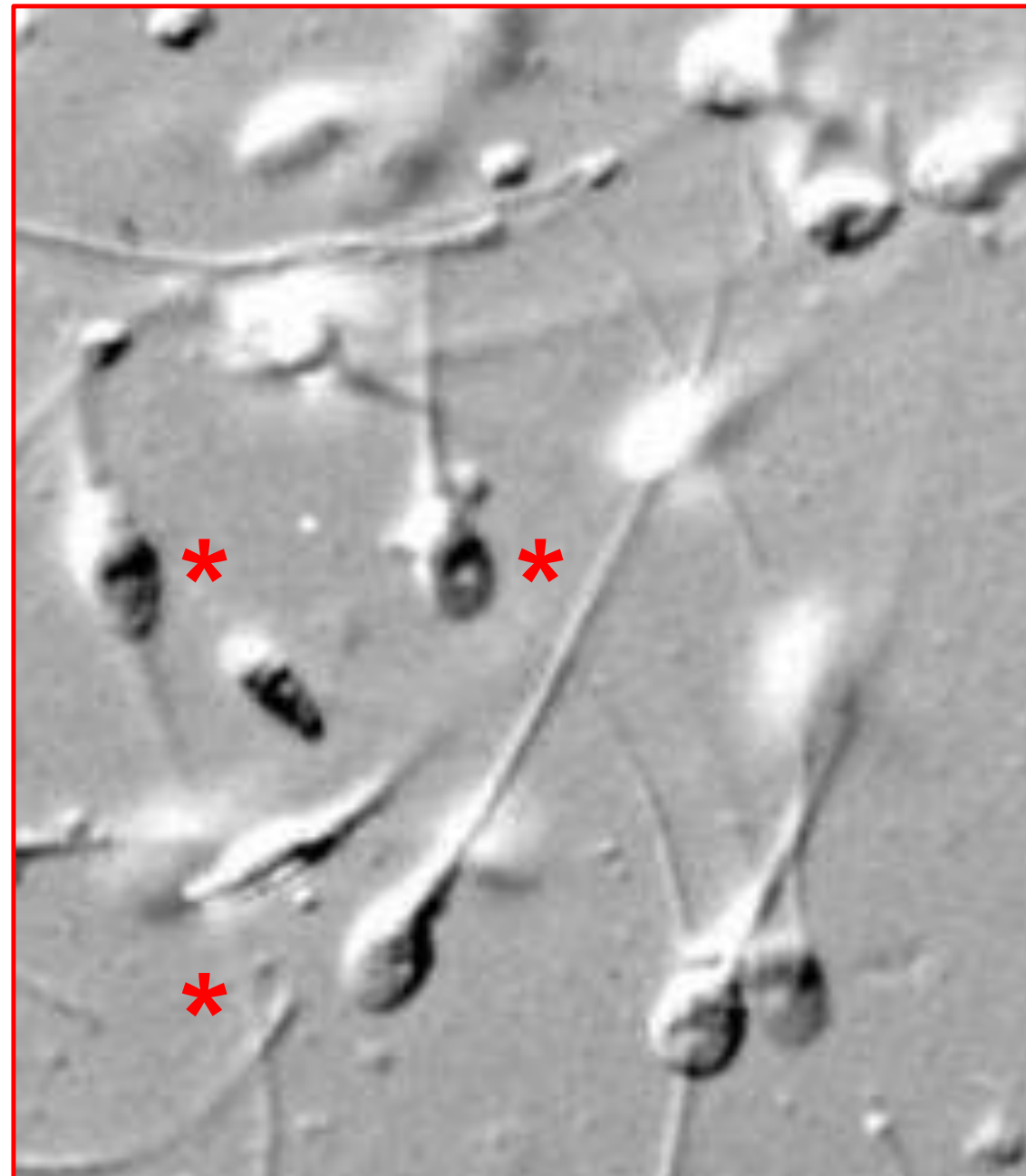
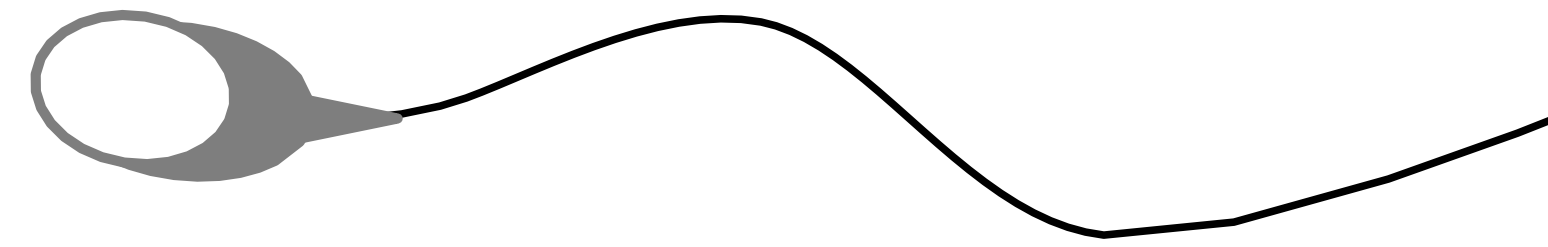
Cognome Nome Data - Luogo nascita



# MORFOLOGIA NEMASPERMICA

## Testa dello Spermatozoo\*:

- Acrosoma = 2/3 della testa
- Nucleo = 1/3 della testa



**NB:** Nelle colorazioni nemaspermiche il nucleo dello spermatozoo normale occupa circa metà della testa (**freccia verde**).



# CINETICA NEMASPERMICA

## CLASSI DI MOTILITÀ

### % Motilità totale (PR+NP):

Spermatozoi che si muovono con moto progressivo + non progressivo

### % Motilità progressiva (PR):

Spermatozoi che progrediscono con moto progressivo (rettilineo) rapido o lento.

### % Motilità non progressiva (NP):

Spermatozoi che non progrediscono, in quanto si muovono con moto confuso o in situ.

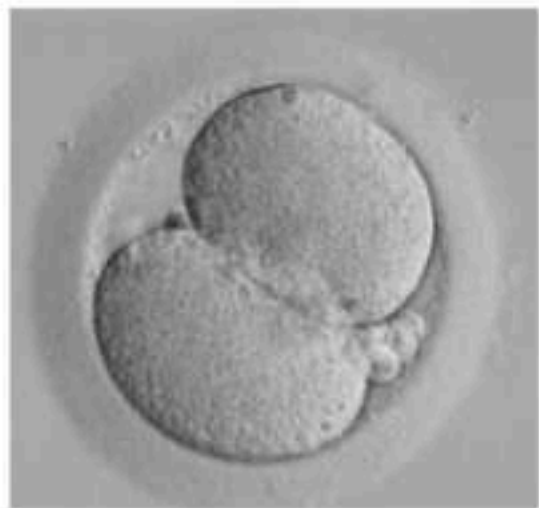
### % Spermatozoi immobili (IM):



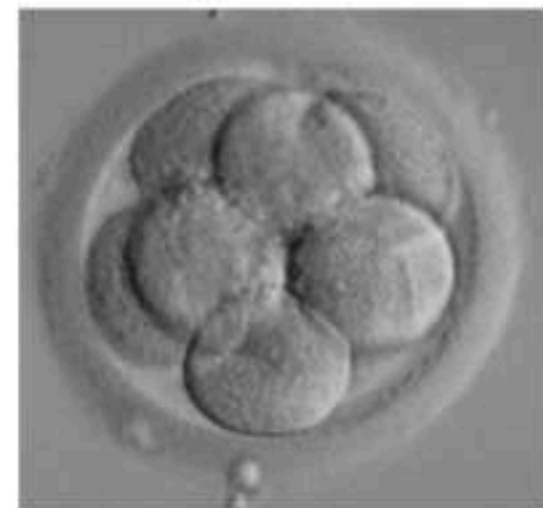
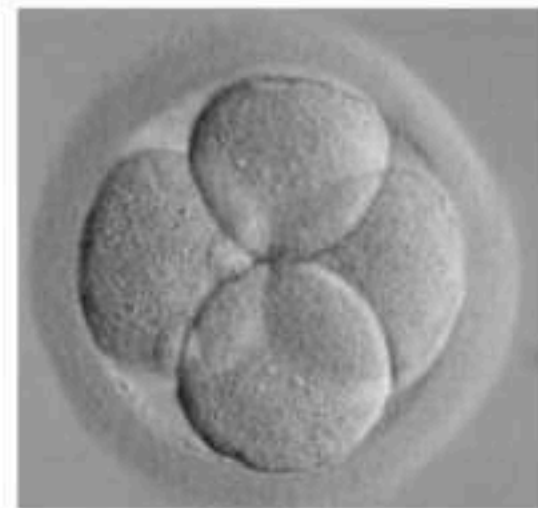
# Fasi di sviluppo di embrioni umani pre-impianto



zigote



embrioni di due giorni: da 2 a 4 cellule



embrione di tre giorni:  
da 6 a 8 cellule



embrioni di quattro/cinque giorni: blastocisti

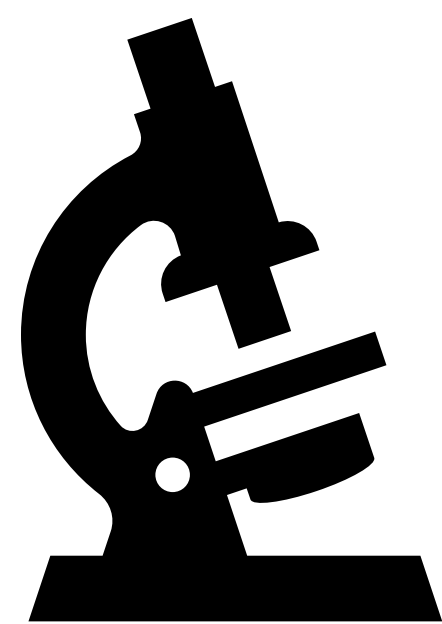


Foto gentilmente concesse dal Dott. Liuzzo  
pma@aopapardo.it



# Il ruolo dell'embriologo clinico

- Organizzazione strutturale del Laboratorio
- Scelta degli strumenti
- Scelta dei materiali e terreni di coltura per gameti ed embrioni
- Scelta dei sistemi di coltura di gameti ed embrioni
- Analisi del liquido seminale
- ICSI/FIVET
- Selezione degli spermatozoi da prelievi biottici, da aspirati testicolari e/o epididimari testicolari per ICSI
- Individuazione della qualità dei gameti, degli ovociti fecondati e degli embrioni preimpianto
- Coltura degli embrioni preimpianto fino allo stadio di blastocisti
- Scelta, preparazione e consegna degli embrioni per il trasferimento intrauterino
- Scelta e validazione delle tecniche di crioconservazione di: spermatozoi, ovociti, uova fecondate, embrioni preimpianto
- Organizzazione delle bio-banche di cellule riproduttive crioconservate
- Biopsia a scopo diagnostico di globuli polari e blastomeri
- Gestione e controllo del sistema di qualità all'interno del Laboratorio di Embriologia clinica
- Interazione e coordinamento con lo staff clinico del Centro.



Dal sito SIERR (*Società Italiana di Embriologia Riproduzione e Ricerca* - [www.sierr.it](http://www.sierr.it))

è possibile effettuare il download della **NORMATIVA NAZIONALE ED INTERNAZIONALE**

**in materia di Procreazione Medicalmente Assistita.**

# La figura dell'embriologo clinico in Italia

**362**  
**CENTRI**  
**PMA**

- **226** privati (62.3%)
- **136** pubblici  
o privati  
convenzionati SSN  
(37.6%)

almeno **800** BIOLOGI

<https://w3.iss.it/site/RegistroPMA/PUB/Centri/CentriPMA.aspx>



definizione del CUN: laureato in Biologia (LM-6) e lauree equiparate che possa dimostrare attraverso certificazioni adeguate un training di almeno 2 anni in un laboratorio di PMA.



# Tutela della professione e della salute pubblica

- importanza dell'iscrizione all'ordine per l'esercizio della professione (ONB)
- società scientifiche (SIGU, SIERR)
- ministero della salute (CNT)

