



AlphaReal BRAF

Scheda Tecnica

Prodotto: AlphaReal BRAF
Codice prodotto: RT 605.48.20
Adempimenti regolatori: IVDD 98/79/CE
N° Tests: 48

Destinazione d'uso - Impatto clinico

Il cancro alla tiroide è il più prevalente tra i tumori endocrini maligni ed è diagnosticato annualmente in 25.700 casi, solo negli Stati Uniti. Sebbene l'eliminazione chirurgica può essere curativa per i tumori alla tiroide ben differenziati scoperti prima che si stabiliscano metastasi locali o distanti, il tasso di mortalità viene valutato comunque in circa 1.500 casi all'anno.

Il gene di B-Raf (BRAF) codifica per una serina-treonina chinasi che svolge un ruolo critico come mediatore della proliferazione cellulare e della sopravvivenza dei segnali trasmessi attraverso la cascata della protein chinasi attivata da mitogeno (MAPK) via Ras-Raf-MEK-ERK. Durante il processo di tumorigenesi vengono selezionate mutazioni tali da permettere un'aberrante attivazione della cascata MAPK, risultando in un costante segnale di proliferazione, differenziamento, sopravvivenza e invasione.

Mutazioni a carico del gene BRAF sono state scoperte in parecchi tumori, incluso il carcinoma papillifero della tiroide, ma il ruolo preciso di BRAF come agente terapeutico per il carcinoma tiroideo è ancora da investigare.

Sono state identificate più di 40 mutazioni del gene BRAF; di queste la mutazione puntiforme T1799A BRAF risulta essere la più comune e corrisponde a più del 90% delle mutazioni trovate nel gene BRAF. Tale mutazione causa la sostituzione amminoacidica V600E nella proteina BRAF, provocando l'attivazione costitutiva e oncogenica della chinasi. Solo raramente sono stati rinvenuti nel tumore alla tiroide altri tipi di mutanti attivi di BRAF: BRAF K601E, AKAP9-BRAF, BRAF V599ins, BRAF V600E_K601del, e V600D_FGLAT601-605ins, un nuovo mutante BRAF caratterizzato di recente che ha origine da un inserimento di 18 basi a partire dal nucleotide T1799 del gene BRAF.

Infatti la mutazione T1799A è presente nel tumore tiroideo familiare ed è praticamente l'unica mutazione BRAF ad essere stata identificata nel tumore alla tiroide (di seguito denominata "mutazione BRAF").

Una scoperta sconvolgente sulla "mutazione BRAF" nel tumore alla tiroide è la sua occorrenza esclusiva nel carcinoma papillifero della tiroide (PTC, con una prevalenza media del 44%) e nel PTC derivato da carcinoma anaplastico della tiroide (ATC, con una prevalenza media del 24%). Essa non ricorre tuttavia nel carcinoma follicolare della tiroide (FTC) o in altri tipi di tumori tiroidei.

Tra le mutazioni somatiche di BRAF rilevate di frequente nei tumori primari e metastatici e nei nevi melanocitici, l'alterazione più comune di BRAF è la V600E. Sono state rilevate tuttavia più di 40 mutazioni BRAF distinte, che variano nella loro attività biologica e possono predire differenze tumorali clinicamente rilevanti. Sebbene l'origine di queste mutazioni rimane sconosciuta, le singole esposizioni ambientali sono probabilmente responsabili del peculiare spettro mutazionale di BRAF osservato nei melanomi. Nei casi di melanoma, le mutazioni BRAF si riscontrano di frequente nei sottotipi istologici a diffusione superficiale o nodulare, nei tumori su zone esposte in maniera intermittente al sole e in pazienti giovani. L'elevata prevalenza e specificità delle mutazioni BRAF per PTC e melanoma suggerisce un unico e fondamentale ruolo patogeno in questa mutazione.

La presenza di mutazioni a carico del gene BRAF può essere considerata anche un marcatore prognostico negativo in pazienti con cancro colo rettale metastatico. Inoltre l'identificazione del mutante BRAF V600E è stata proposta come marcatore diagnostico per discriminare il cancro al colon sporadico caratterizzato da instabilità microsatellitare dal carcinoma del colon ereditario non poliposico (Sindrome di Lynch, HNPCC). L'analisi della mutazione BRAF V600E potrebbe quindi essere utilizzata come una veloce strategia a basso costo al fine di semplificare la complessa e costosa diagnosi genetica di HNPCC.

Tutti questi studi hanno suscitato grande entusiasmo negli ultimi anni rispetto ad una potenziale utilità clinica della mutazione BRAF V600E come nuovo marcatore diagnostico, prognostico e come target efficace nel trattamento del cancro alla tiroide, al colon e dei melanomi.

Principio del metodo

Il kit AlphaReal BRAF è un dispositivo in vitro diagnostico per identificare la presenza della mutazione puntiforme T1799A (V600E) all'interno del gene BRAF, correlata ad una minore sopravvivenza in soggetti con diversi tipi di tumore (tiroide, melanoma e colon).

I laboratori Alphagenics Biotechnologies hanno sviluppato un efficace saggio basato su una PCR Real Time quantitativa per identificare una quantità minima di V600E BRAF in un grande quantitativo di DNA di BRAF non mutato.

Strumentazione

L'applicazione di tecniche di fluorescenza ai protocolli di PCR e l'utilizzo di una opportuna strumentazione in grado di combinare l'amplificazione, l'individuazione e la quantificazione, hanno portato allo sviluppo della PCR cinetica e delle metodologie di PCR Real Time che stanno rivoluzionando la possibilità di quantificare gli acidi nucleici.

La PCR Real Time consente di amplificare e rilevare il segnale simultaneamente in un sistema chiuso, evitando il rischio di contaminazioni. L'acquisizione e l'analisi dei dati si ottengono in breve tempo, riducendo al minimo il tempo di manipolazione. L'intero processo, che parte dalla PCR Real Time e termina con la quantificazione, è automatico, il che rende questa soluzione ideale per applicazioni di screening ad altissimo rendimento.

Il kit per la determinazione degli alleli di BRAF è stato ottimizzato utilizzando gli strumenti Mx3000TM (Stratagene) e ABI Prism7000TM (Applied Biosystems), ma è utilizzabile anche con i seguenti termociclatori PCR Real Time presenti sul mercato (Stratagene Mx4000, Applied Biosystems Prism7300/7500/7900TM, Biorad CFX96 e Biorad MiniOpticon, Applied Biosystems StepOneTM, Roche - LightCycler® 480 System).

Limitazioni nell'uso del prodotto

Questo kit è utilizzabile esclusivamente per diagnosi in vitro. Il prodotto non può essere rivenduto alterandone il contenuto senza il consenso scritto da parte dell'azienda. Il prodotto deve essere utilizzato solo da personale specificamente istruito e formato sulle procedure diagnostiche in vitro.

Limitazioni del metodo

Il kit AlphaReal BRAF non funziona su DNA fortemente frammentato causato da eccessiva fissazione.

Il limite di individuazione è condizionato dalla durata di fissazione in formalina. Se il tessuto è fissato per più di 24 ore, gli acidi nucleici saranno di scarsa qualità.

Sensibilità analitica

Il limite di individuazione analitica (limite di sensibilità) del kit AlphaReal BRAF è dell'1%.

Controllo di qualità

In accordo con il Sistema di Gestione della Qualità UNI EN ISO 13485:2012 dell'azienda, ogni lotto del kit AlphaReal BRAF è testato a fronte di specifiche predeterminate in modo da garantire la qualità del prodotto.

Tempistiche del saggio

Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE): 20 ore; PCR Real Time: 120 minuti; Analisi dei dati: 30 minuti.

Totale: 2 ore e 30 minuti

Nota 1: Le tempistiche descritte escludono il processo di estrazione

Nota 2: Il tempo indicato si riferisce al processamento di un singolo campione

Nota 3: La tempistica del saggio dipende dal numero di campioni da processare

Nota 4: Il tempo di lavoro del singolo utente è di circa 4 ore.

AlphaGenics Biotech

AREA Science Park- Basovizza
Edificio Q1- Statale 14 Km 169,5
34149 Trieste

Tel: +390403755682- Fax: +390403755681

Email: info@alphagenicsbiotech.com

P.I.C.F 01251340327