

# Manuale del kit *therascreen*<sup>®</sup> MGMT Pyro<sup>®</sup>



Versione 1

**IVD**

Per uso diagnostico in vitro

**CE**

**REF** 971061

**HB** 1061267IT

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

**R4** **MAT** 1061826IT



## **Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN**

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

### **QIAGEN pone nuovi standard:**

- nella purificazione di DNA, RNA e proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca su microRNA e RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Indice generale

<b>Usò previsto</b>	<b>5</b>
<b>Riassunto e spiegazione</b>	<b>5</b>
<b>Principio della procedura</b>	<b>6</b>
Controlli	7
<b>Materiale fornito</b>	<b>8</b>
Contenuto del kit	8
<b>Materiale necessario ma non fornito</b>	<b>10</b>
Miscelatori per piastre raccomandati	11
<b>Avvertenze e precauzioni</b>	<b>11</b>
Informazioni per la sicurezza	12
Precauzioni generali	12
<b>Conservazione e manipolazione dei reagenti</b>	<b>13</b>
<b>Conservazione e manipolazione dei campioni</b>	<b>14</b>
<b>Procedura</b>	<b>15</b>
Isolamento del DNA e conversione con bisolfito	15
Protocolli	
■ 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24	16
■ 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	19
■ 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance	22
■ 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24	24
■ 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24	28
■ 6: analisi di un processo PyroMark Q24	31
<b>Interpretazione dei risultati</b>	<b>32</b>
Guida alla risoluzione dei problemi	34
<b>Controllo di qualità</b>	<b>37</b>
<b>Limitazioni</b>	<b>37</b>
<b>Caratteristiche prestazionali</b>	<b>38</b>
Limite del bianco	38
Linearità	38

Precisione	40
Valutazione diagnostica	42
<b>Riferimenti bibliografici</b>	<b>45</b>
<b>Simboli</b>	<b>46</b>
<b>Indirizzi utili</b>	<b>46</b>
<b>Appendice A: configurazione del dosaggio MGMT</b>	<b>47</b>
<b>Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti</b>	<b>48</b>
<b>Informazioni per gli ordini</b>	<b>50</b>

## Uso previsto

Il kit *therascreen* MGMT Pyro è un test *in vitro* destinato alla rilevazione della sequenza dell'acido nucleico, basato sulla tecnologia Pyrosequencing® per la misurazione quantitativa dello stato di metilazione nell'esone 1 del gene MGMT umano in DNA genomico ottenuto da campioni di tessuto umano.

L'uso del kit *therascreen* MGMT Pyro, insieme ad altri fattori prognostici, fornisce ai medici informazioni utili per la selezione dei pazienti oncologici che possono trarre maggiore beneficio dalle chemioterapie. Per uso diagnostico *in vitro*.

Da utilizzarsi esclusivamente con il sistema PyroMark® Q24. I sistemi PyroMark Q24 comprendono:

- Gli strumenti PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- Le stazioni di lavoro del vuoto PyroMark Q24 e PyroMark Q24 MDx.
- Il software PyroMark Q24 (versione 2.0) e il software PyroMark Q24 MDx (versione 2.0).

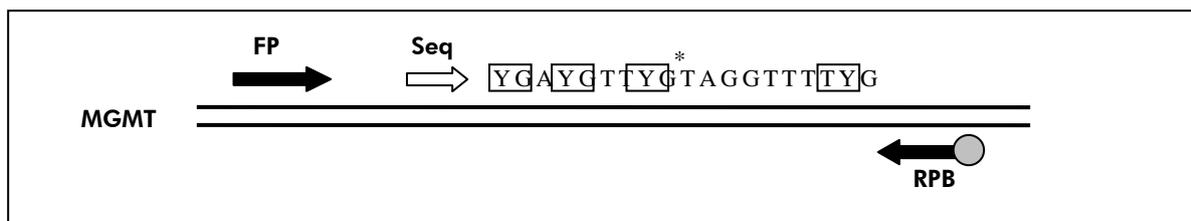
Il prodotto è destinato ad utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle procedure diagnostiche *in vitro* e nell'uso delle tecniche di biologia molecolare e del sistema PyroMark Q24.

## Riassunto e spiegazione

Il kit *therascreen* MGMT Pyro è destinato alla misurazione quantitativa della metilazione in quattro siti CpG nell'esone 1 del gene MGMT umano (sequenza genomica sul cromosoma 10 da 131.265.519 a 131.265.537:

CGACGCCCGCAGGTCCTCG). Dopo la conversione con bisolfito, il DNA genomico viene amplificato tramite PCR e sequenziato per tutta la regione definita nella direzione in avanti (Figura 1). Le sequenze attorno alle posizioni definite servono da picchi di riferimento e di normalizzazione per la quantificazione e la valutazione della qualità dell'analisi.

Il prodotto è costituito da due fiale di miscela di primer per PCR e due fiale di primer di sequenziamento. I primer vengono forniti in soluzione. Ogni fiala contiene 24 µl di primer o miscela di primer. Il kit contiene primer e reagenti per l'amplificazione dei geni, nonché tamponi, primer e reagenti per la rilevazione quantitativa real-time della metilazione mediante tecnologia Pyrosequencing sul sistema PyroMark Q24.



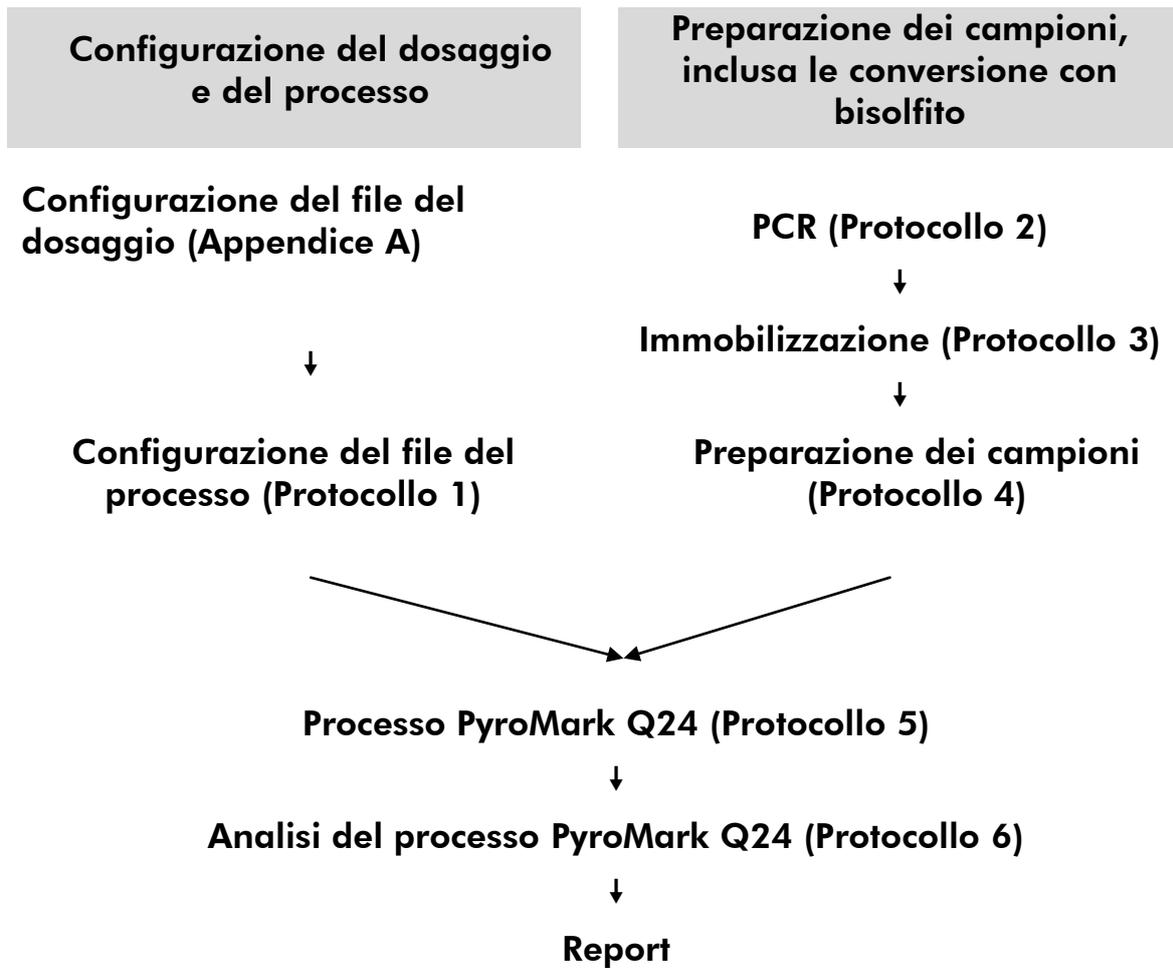
**Figura 1. Illustrazione del dosaggio MGMT.** La sequenza indicata è la sequenza analizzata dopo la conversione con bisolfito. Y indica i siti potenzialmente metilati e le caselle indicano i siti CpG analizzati. L'asterisco indica il sito per il controllo della conversione con bisolfito. **FP**: Forward PCR Primer, primer diretto per PCR; **RPB**: Reverse PCR Primer, primer inverso per PCR (**B** indica biotinilazione); **Seq**: primer di sequenziamento.

## Principio della procedura

Il flusso di lavoro seguente illustra la procedura del dosaggio. Dopo aver eseguito la PCR con i primer target per la regione definita dell'esone 1, gli ampliconi sono immobilizzati su grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose® High Performance). Si forma il DNA a filamento singolo e il primer di sequenziamento si riassocia al DNA (annealing). A questo punto i campioni vengono analizzati sul sistema PyroMark Q24 utilizzando un file di configurazione del dosaggio e un file del processo.

**Nota:** il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* (vedere "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24", pagina 24).

## Flusso di lavoro della procedura *therascreen* MGMT Pyro



## Controlli

Il DNA di controllo metilato è incluso nel kit come controllo positivo per la PCR e le reazioni di sequenziamento. Tale DNA di controllo è altamente metilato e convertito con bisolfito. Per poter effettuare un confronto, è consigliabile includere in ogni processo di pirosequenziamento anche un campione ematico di DNA ottenuto da un donatore sano. È inoltre necessario includere un controllo negativo (senza DNA template) in ogni allestimento PCR.

## Materiale fornito

### Contenuto del kit

#### *therascreen* MGMT Pyro Kit (scatola 1/2)

<b>Kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro</b>	<b>(48)</b>
<b>N° di catalogo</b>	<b>971061</b>
<b>N° di reazioni</b>	<b>48</b>
PCR Primer Mix MGMT (Miscela di primer per PCR MGMT)	2 x 24 µl
Seq Primer MGMT (Primer di sequenziamento MGMT)	2 x 24 µl
PyroMark PCR Master Mix (Master Mix per PCR PyroMark), 2x	850 µl
CoralLoad® Concentrate (Concentrato CoralLoad®), 10x	1,2 ml
H <sub>2</sub> O	3 x 1,9 ml
Methylated Control DNA (DNA di controllo metilato), 10 ng/µl	100 µl

## **therascreen Pyro buffers and reagents (scatola 2/2)**

<b>therascreen Pyro buffers and reagents</b>		
PyroMark Binding Buffer (Tampone di legame PyroMark)		10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampone di annealing PyroMark)		10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Soluzione di denaturazione PyroMark)*		250 ml
PyroMark Wash Buffer (Tampone di lavaggio PyroMark), 10x		25 ml
Enzyme Mixture (Miscela enzimatica)		1 fiala
Substrate Mixture (Miscela di substrato)		1 fiala
dATP $\alpha$ S		1180 $\mu$ l
dCTP		1180 $\mu$ l
dGTP		1180 $\mu$ l
dTTP		1180 $\mu$ l
Handbook (Manuale)		1

\* Contiene idrossido di sodio.

## Materiale necessario ma non fornito

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Kit di isolamento del DNA (vedere “Isolamento del DNA e conversione con bisolfito”, pagina 15)
- Reagenti per la conversione del DNA con bisolfito (vedere “Isolamento del DNA e conversione con bisolfito”, pagina 15)
- Pipette (regolabili)\*
- Puntali per pipette sterili (con filtri per l’allestimento PCR)
- Microcentrifuga da tavolo\*
- Termociclatore e provette per PCR idonee
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° di catalogo 17-5113-01; [www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com))
- PyroMark Q24 (n° di catalogo 9001513 o 9001514)\*†
- Software PyroMark Q24 (n° di catalogo 9019062 o 9019063)†
- Piastra PyroMark Q24 (n° di catalogo 979201)†
- Cartuccia PyroMark Q24 (n° di catalogo 979202)†
- Stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 (n° di catalogo 9001515 o 9001517)\*†
- Miscelatore per piastre\* per immobilizzazione su grani (vedere “Miscelatori per piastre raccomandati”, pagina 11)
- Blocco riscaldante\* in grado di raggiungere 80°C
- Piastra per PCR a 24 pozzetti o strisce
- Tappi per strisce

\* Assicurarsi che tutti gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

† Con marchio CE-IVD, in conformità alla Direttiva UE 98/79/CE. Tutti gli altri prodotti citati non hanno il marchio CE-IVD in base alla Direttiva UE 98/79/CE.

- Acqua altamente depurata (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente)  
**Nota:** il prodotto contiene una quantità di acqua sufficiente per la PCR, l'immobilizzazione del DNA e il dissolvimento delle miscele enzimatica e di substrato; è necessario reperire altra acqua altamente depurata per la diluizione del tampone di lavaggio PyroMark 10x.
- Etanolo (70%)\*

## Miscelatori per piastre raccomandati

Con il kit *therascreen MGMT Pyro* è consigliabile utilizzare i miscelatori per piastre elencati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Miscelatori per piastre raccomandati per l'uso con il kit *therascreen MGMT Pyro***

Produttore	Prodotto	Numero di catalogo
Eppendorf	Termomiscelatore comfort (strumento base)	5355 000.011
	Termoblocco per piastre di microtitolazione	5363 000.012
	Piastra adattatore per provette PCR 96 x 0,2 ml, da inserire nel blocco intercambiabile per piastre di microtitolazione	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Agitatore magnetico Variomag® Teleshake	51410 (115 V=51410 U)
	Agitatore magnetico Variomag Monoshake	51110 (115 V=51110 U)

## Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

\* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

## Informazioni per la sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare le schede MSDS per ognuno dei kit e dei componenti dei kit QIAGEN®.

Le seguenti frasi precauzionali e di rischio sono valide per i componenti kit *therascreen* MGMT Pyro.

### PyroMark Denaturation Solution



Attenzione! Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può essere corrosivo per i metalli. Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali. Conservare soltanto nel contenitore originale. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

### PyroMark Enzyme Mixture



Contiene: (R\*,R\*)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol; acetic acid. Pericolo! Provoca irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. In caso di esposizione o possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un dottore/medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

### PyroMark Substrate Mixture



Contiene: acetic acid. Attenzione! Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

## Precauzioni generali

L'utente deve prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni.

- Per ottenere risultati ottimali, è necessario osservare scrupolosamente le istruzioni fornite nel manuale utente. La diluizione dei reagenti, salvo con le modalità descritte in questo manuale, è sconsigliata in quanto potrebbe determinare un decadimento delle prestazioni.

- Si osservi che il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* (vedere "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24", pagina 24).
- I componenti di questo prodotto sono sufficienti per analizzare 48 reazioni in un massimo di 5 processi indipendenti.
- Utilizzare puntali per pipette sterili con filtri (per la configurazione della PCR).
- Conservare ed estrarre il materiale positivo (campioni, controlli positivi e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungere questi componenti alla miscela di reazione in un'area del laboratorio separata fisicamente.
- Scongelare completamente tutti i componenti a temperatura ambiente (15-25°C) prima di iniziare un test.
- Dopo lo scongelamento, miscelare i componenti (pipettando più volte su e giù o agitando in vortex ad impulsi) e centrifugare brevemente.
- I risultati errati non possono essere utilizzati come base per una valutazione dello stato di metilazione.

## Conservazione e manipolazione dei reagenti

Il kit *therascreen MGMT Pyro* viene consegnato in due scatole. Il contenuto della scatola 1/2 del kit *therascreen MGMT Pyro* viene spedito in ghiaccio secco. Subito dopo la consegna, conservare la soluzione Master Mix per PCR PyroMark, il concentrato CoralLoad, il DNA di controllo metilato e tutti i primer a una temperatura compresa tra -30 e -15°C.

Il contenuto della scatola 2/2 dei tamponi e dei reagenti *therascreen Pyro* (tamponi, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP e dTTP, in altre parole i reagenti per l'analisi di pirosequenziamento) viene spedito in confezioni refrigerate. Conservare questi componenti a 2-8°C dal momento della consegna. Per ridurre al minimo la perdita di attività, è consigliabile conservare sia la miscela enzimatica che la miscela di substrato nelle fiale originali.

Le miscele enzimatiche e di substrato ricostituite sono stabili per almeno 10 giorni a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, è possibile congelare le miscele enzimatiche e di substrato e conservarle nelle fiale originali a una temperatura compresa tra -30 e -15°C. I reagenti congelati non devono essere sottoposti a più di 6 cicli di congelamento-scongelamento.

**Nota:** i nucleotidi non devono essere congelati.

Il kit *therascreen MGMT Pyro* è stabile fino alla data di scadenza indicata, se conservato alle condizioni raccomandate.

## **Conservazione e manipolazione dei campioni**

Tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.

Il materiale campione è DNA umano convertito con bisolfito, estratto da sangue o da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Non è consentito l'uso di campioni umani prelevati da soggetti in cura con eparina. Non è consentito l'uso di campioni ematici raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. L'eparina compromette la PCR.

## Procedura

### Isolamento del DNA e conversione con bisolfito

Le prestazioni del sistema sono state determinate utilizzando i kit EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue e QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue per l'estrazione del DNA umano a partire da campioni tumorali FFPE. Per quanto riguarda il sistema del kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, le prestazioni sono state determinate utilizzando campioni ematici di donatori sani arricchiti con cellule tumorali.

È consigliato l'uso dei kit QIAGEN descritti nella Tabella 2 per la purificazione del DNA dei tipi di campioni umani da analizzare con il kit *therascreen* MGMT Pyro. Eseguire la purificazione del DNA nel rispetto delle istruzioni contenute nei manuali dei kit.

Per la conversione con bisolfito, è consigliato l'uso del kit EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite (n° di catalogo 59104), del kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° di catalogo 59144) o del kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° di catalogo 59124) di QIAGEN.

**Tabella 2. Kit di purificazione del DNA consigliati per l'uso con il kit *therascreen* MGMT Pyro**

<b>Materiale campione</b>	<b>Kit per l'isolamento degli acidi nucleici</b>	<b>Numero di catalogo (QIAGEN)</b>
Tessuto incluso in paraffina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	56404 953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit <sup>†</sup>	61104

\* Seguire il protocollo per l'uso con tessuto incluso in paraffina. Utilizzare il prodotto EZ1 DNA Tissue Kit con la combinazione EZ1 Advanced (n° di cat. 9001410 o 9001411) ed EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018298), con la combinazione EZ1 Advanced XL (n° di cat. 9001492) ed EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018700) oppure con la combinazione BioRobot<sup>®</sup> EZ1 (n° di cat. 9000705; non più disponibile) ed EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9015862).

<sup>†</sup> Con marchio CE-IVD, in conformità alla Direttiva UE 98/79/CE.

# Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24

## Punti importanti prima di iniziare

- Se necessario, è possibile confermare il valore LOB utilizzando campioni ematici di un donatore sano per generare un'intera piastra di risultati. Per maggiori dettagli, fare riferimento al documento di indirizzo CLSI Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline".

## Prima di iniziare

- Creare una configurazione del dosaggio come descritto nell'Appendice A, pagina 47. Questa operazione deve essere effettuata una sola volta, prima di eseguire il dosaggio *therascreen* MGMT per la prima volta.

## Procedura

- 1. Fare clic su  nella barra degli strumenti.**  
Viene creato un nuovo file di processo.
- 2. Immettere i parametri del processo (vedere "Parametri del processo", pagina 17).**
- 3. Preparare la piastra aggiungendo il dosaggio nei pozzetti che corrispondono ai campioni da analizzare.**  
**Nota:** è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA templatato) in ogni allestimento PCR.  
**Nota:** per poter effettuare un confronto, è consigliabile includere in ogni processo di pirosequenziamento anche un campione ematico di DNA ottenuto da un donatore sano. È possibile includere un campione con DNA di controllo metilato come controllo positivo per le reazioni PCR e di sequenziamento (vedere "Controlli", pagina 7).
- 4. Quando il processo è configurato e pronto per essere avviato sul sistema PyroMark Q24, stampare un elenco dei volumi richiesti per la miscela enzimatica, la miscela di substrato e i nucleotidi, quindi stampare la configurazione della piastra. Selezionare "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione) dal menu "Tools" (Strumenti) e, quando viene visualizzato il report, fare clic su .**
- 5. Chiudere il file di processo e copiarlo su una penna USB (fornita con il sistema) utilizzando Windows® Explorer.**

Le informazioni pre-elaborazione stampate possono essere utilizzate come modello per la preparazione del campione (vedere "Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance", pagina 22).

Per avviare l'elaborazione della piastra sul sistema PyroMark Q24, vedere "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 28.

### Parametri del processo

"Run name" (Nome processo):	Il nome del processo viene assegnato al momento del salvataggio del file. Se il file viene ridenominato, anche il processo viene ridenominato.
"Instrument method" (Metodo strumento):	Selezionare il metodo dello strumento in base alla cartuccia che verrà utilizzata per il processo. Fare riferimento alle istruzioni fornite con i prodotti.
"Plate ID" (ID della piastra):	<b>Facoltativo:</b> immettere l'ID della piastra PyroMark Q24.
"Bar code" (Codice a barre):	<b>Facoltativo:</b> immettere un numero di codice a barre per la piastra oppure, se un lettore di codici a barre è collegato al computer, fare clic nella casella di testo "Barcode" (Codice a barre) e avviare la scansione.
"Reagent ID" (ID reagente):	<b>Facoltativo:</b> immettere i numeri di lotto delle scatole 1 e 2 del kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro da utilizzare. Il numero di lotto è indicato sull'etichetta del prodotto. <b>Nota:</b> indicare sempre il numero di lotto, in modo da facilitare la ricostruzione di eventuali problemi imprevisti con il kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro.
"Run note" (Nota sul processo):	<b>Facoltativo:</b> immettere un commento per spiegare il contenuto o la finalità del processo.

### Aggiungere i file dei dosaggi

Per aggiungere un dosaggio in un pozzetto, sono disponibili due alternative:

- Fare clic con il pulsante destro del mouse sul pozzetto, quindi selezionare "Load Assay" (Carica dosaggio) dal menu di scelta rapida.
- Selezionare il dosaggio nel browser dei collegamenti, quindi fare clic e trascinare il dosaggio fino al pozzetto.

Il colore del pozzetto cambia a seconda del dosaggio caricato.

### **Immettere gli ID dei campioni e le note**

Per immettere l'ID di un campione o una nota, selezionare la cella e inserire il testo.

Per modificare l'ID di un campione o una nota, selezionare la cella (verrà selezionato il contenuto corrente) oppure fare doppio clic sulla cella.

## Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit *therascreen* MGMT Pyro

Questo protocollo è destinato all'amplificazione PCR di una regione di DNA convertito con bisolfite tramite il kit *therascreen* MGMT Pyro.

### Punti importanti prima di iniziare

- La DNA polimerasi HotStarTaq<sup>®</sup> contenuta nel Master Mix PCR PyroMark necessita di una fase di attivazione di **15 minuti a 95°C**.
- Preparare tutte le miscele di reazione in un'area del laboratorio separata dall'area in cui si esegue la purificazione del DNA, l'aggiunta del DNA template alla PCR, l'analisi del prodotto della PCR o la preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento.
- Utilizzare puntali monouso contenenti filtri idrofobici per ridurre al minimo la contaminazione crociata.
- Utilizzare DNA convertito con bisolfite come DNA template. È consigliato l'uso del kit EpiTect<sup>®</sup> Bisulfite (n° di catalogo 59104), del kit EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° di catalogo 59144) o del kit EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° di catalogo 59124) di QIAGEN.

### Prima di iniziare

- Prima di aprire la provetta con il primer per PCR, centrifugare brevemente per fare depositare il contenuto sul fondo.
- Se necessario, correggere la concentrazione del DNA del campione fino a 2-10 ng/μl.

### Procedura

#### 1. Scongelare tutti i componenti necessari.

Miscelare con cura prima dell'uso.

#### 2. Preparare una miscela di reazione facendo riferimento alla Tabella 3.

La miscela di reazione contiene in genere tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Preparare un volume maggiorato rispetto alla miscela di reazione necessaria per il numero totale di dosaggi PCR da eseguire.

**Tabella 3. Preparazione della miscela di reazione**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reazione (<math>\mu</math>l)</b>
Master Mix per PCR PyroMark, 2x	12,5
Concentrato CoralLoad, 10x	2,5
Miscela di primer per PCR MGMT	1,0
Acqua (H <sub>2</sub> O, fornita)	4,0
<b>Volume totale</b>	<b>20,0</b>

**3. Mescolare la miscela di reazione accuratamente, quindi dispensare 20  $\mu$ l in ogni provetta per PCR.**

Non è necessario conservare le provette per PCR su ghiaccio, in quanto la DNA polimerasi HotStarTaq è inattiva a temperatura ambiente.

**4. Aggiungere 5  $\mu$ l di DNA templatato convertito con bisolfito (10-50 ng di DNA genomico secondo le misurazioni eseguite prima della conversione con bisolfito) nelle singole provette per PCR (Tabella 4) e miscelare con cura.**

**Nota:** è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA templatato) in ogni allestimento PCR.

**Nota:** per poter effettuare un confronto, è consigliabile includere in ogni processo di pirosequenziamento anche un campione ematico di DNA ottenuto da un donatore sano. È possibile includere un campione con DNA di controllo metilato come controllo positivo per le reazioni PCR e di sequenziamento (vedere "Controlli", pagina 7).

**Tabella 4. Preparazione della PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volume/reazione (<math>\mu</math>l)</b>
Miscela di reazione	20
DNA campione	5
<b>Volume totale</b>	<b>25</b>

5. Programmare il termociclatore in base alle istruzioni del produttore, facendo riferimento alle condizioni descritte nella Tabella 5.

**Tabella 5. Protocollo di ciclaggio ottimizzato**

			Commenti
<b>Fase di attivazione iniziale:</b>	15 minuti	95°C	La DNA polimerasi HotStarTaq viene attivata da questa fase di riscaldamento.
<b>Ciclaggio a 3 fasi:</b>			
Denaturazione	20 secondi	95°C	
Annealing	30 secondi	53°C	
Estensione	20 secondi	72°C	
Numero di cicli	42		
<b>Estensione finale:</b>	5 minuti	72°C	

6. Posizionare le provette PCR nel termociclatore e avviare il programma di ciclaggio.
7. Dopo l'amplificazione, passare alla procedura "Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance", pagina 22.

## Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance

Questo protocollo prevede l'immobilizzazione del DNA template su grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose High Performance, di GE Healthcare) prima dell'analisi con il sistema PyroMark Q24.

### Punti importanti prima di iniziare

- Prima di iniziare, attendere che tutti i reagenti e le soluzioni raggiungano la temperatura ambiente (15-25°C).

### Procedura

1. **Agitare delicatamente il flacone contenente i grani Streptavidin Sepharose High Performance finché la soluzione appare omogenea.**
2. **Preparare una soluzione Master Mix per l'immobilizzazione del DNA facendo riferimento alla Tabella 6.** Preparare un volume maggiorato del 10% rispetto al volume necessario per il numero totale di reazioni da eseguire.

**Tabella 6. Soluzione Master Mix per l'immobilizzazione del DNA**

<b>Componente</b>	<b>Volume/campione (μl)</b>
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Tampone di legame PyroMark	40
Acqua (H <sub>2</sub> O, fornita)	28
<b>Volume totale</b>	<b>70</b>

3. **Aggiungere 70 μl di soluzione Master Mix nei pozzetti della piastra per PCR a 24 pozzetti (o nelle strisce), in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 16).**
4. **Aggiungere 10 μl di prodotto della PCR biotinilato (ottenuto dal Protocollo 2) in ogni pozzetto contenente la soluzione Master Mix, in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti inclusi nel kit *therascreen* MGMT Pyro", pagina 19).**

Il volume totale contenuto in ogni pozzetto dovrebbe essere di 80 μl, dopo l'aggiunta della soluzione Master Mix e del prodotto della PCR.

**5. Sigillare la piastra per PCR (o le strisce) utilizzando i tappi per strisce.**

Assicurarsi che il liquido non possa filtrare da un pozzetto all'altro.

**6. Agitare la piastra per PCR a temperatura ambiente (15-25°C) per 5-10 minuti a 1400 rpm.**

Nel mentre preparare la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 per la preparazione dei campioni, secondo le indicazioni contenute nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

**7. Passare immediatamente alla procedura "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24", pagina 24.**

**Nota:** i grani Sepharose sedimentano velocemente. La cattura dei grani deve avvenire immediatamente dopo l'agitazione.

Se è trascorso più di 1 minuto dall'agitazione della piastra (o delle strisce), agitare di nuovo per 1 minuto prima di catturare i grani.

## Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento sul sistema PyroMark Q24

Questo protocollo prevede la preparazione del DNA a filamento singolo e l'annealing del primer di sequenziamento con il template prima dell'analisi di pirosequenziamento sullo strumento PyroMark Q24.

### Punti importanti prima di iniziare

- Aggiungere il primer di sequenziamento seguendo lo stesso schema descritto per la piastra nella configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 16).
- Il flusso di lavoro è stato leggermente modificato rispetto a quello descritto nel manuale *PyroMark Q24 User Manual* (punto 18). Non abbreviare il periodo di raffreddamento dei campioni dopo averli riscaldati a 80°C.
- Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro in base alle istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*, rispettando scadenze regolari e sostituendo le sonde del filtro se necessario.

### Prima di iniziare

- Prima di aprire la provetta con il primer di sequenziamento, centrifugare brevemente per far depositare il contenuto sul fondo.
- Posizionare un portapiastre PyroMark Q24 su un blocco preriscaldato a 80°C (da utilizzare al punto 17). Lasciare un secondo portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C) (da utilizzare al punto 18).
- Il tampone di lavaggio PyroMark viene fornito in forma concentrata 10x. Prima di utilizzare il tampone per la prima volta, aggiungere acqua altamente depurata a 25 ml di tampone di lavaggio PyroMark 10x, così da ottenere un volume finale di 250 ml e una soluzione di lavoro 1x.

La soluzione di lavoro tampone di lavaggio PyroMark 1x è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### Procedura

#### 1. Diluire una quantità sufficiente di primer di sequenziamento (Seq Primer MGMT) nel tampone di annealing PyroMark, come illustrato nella Tabella 7.

Preparare il primer di sequenziamento diluito in volume maggiorato rispetto al volume necessario per eseguire il sequenziamento di tutti i campioni (una quantità sufficiente per il numero di campioni + uno).

**Tabella 7. Esempio di diluizione del primer di sequenziamento**

<b>Componente</b>	<b>Volume/campione (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volume per 9 + 1 reazioni (<math>\mu</math>l)</b>
Primer di sequenziamento MGMT	0,8	8,0
Tampone di annealing PyroMark	24,2	242,0
<b>Volume totale</b>	<b>25,0</b>	<b>250,0</b>

- 2. Aggiungere 25  $\mu$ l di primer di sequenziamento diluito in ogni pozzetto della piastra PyroMark Q24, in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 16).**

Conservare uno dei portapiastre PyroMark Q24 (forniti con la stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24) a temperatura ambiente (15-25°C) e utilizzarlo come sostegno durante la preparazione e il trasferimento della piastra.

- 3. Appoggiare sul tavolo da lavoro la piastra per PCR (o le strisce) del Protocollo 3 e la piastra PyroMark Q24 (Figura 2).**

Assicurarsi che la piastra abbia lo stesso orientamento che aveva durante il caricamento dei campioni.



**Figura 2. Posizionamento della piastra per PCR (o delle strisce) e della piastra PyroMark Q24 sulla stazione del vuoto.**

- 4. Applicare il vuoto allo strumento aprendo l'interruttore del vuoto.**

5. **Immergere delicatamente le sonde del filtro dello strumento del vuoto nella piastra per PCR (o nelle strisce), in modo da catturare i grani contenenti il templat immobilizzato. Tenere le sonde in posizione per 15 secondi. Estrarre lo strumento del vuoto con cautela.**

**Nota:** i grani Sepharose sedimentano velocemente. La cattura dei grani deve avvenire immediatamente dopo l'agitazione.

Se è trascorso più di 1 minuto dall'agitazione della piastra (o delle strisce), agitare di nuovo per 1 minuto prima di catturare i grani.

6. **Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di etanolo al 70% (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.**
7. **Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di soluzione di denaturazione (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.**
8. **Trasferire lo strumento nel recipiente che contiene 50 ml di tampone di lavaggio (Figura 2). Sciacquare le sonde del filtro per 10 secondi.**
9. **Sollevare lo strumento del vuoto e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo che tutto il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 3).**



Figura 3. Illustrazione dello strumento del vuoto sollevato e inclinato di oltre 90° in senso verticale.

10. **Tenendo lo strumento del vuoto sopra la piastra PyroMark Q24, chiudere l'interruttore del vuoto sullo strumento (Off).**
11. **Liberare i grani nella piastra PyroMark Q24 immergendo le sonde del filtro nel primer di sequenziamento diluito e muovendo con cautela lo strumento da un lato all'altro.**  
Fare attenzione a non danneggiare la superficie della piastra PyroMark Q24 graffiandola con le sonde del filtro.
12. **Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene acqua altamente depurata (Figura 2) e agitare lo strumento per 10 secondi.**

- 13. Lavare le sonde del filtro immergendole nell'acqua altamente depurata (Figura 2) e applicando il vuoto. Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata.**
- 14. Sollevare lo strumento e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo che tutto il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 3).**
- 15. Chiudere l'interruttore del vuoto sullo strumento (Off), quindi sistemare lo strumento nella posizione di sosta (P).**
- 16. Spegnerne la pompa del vuoto.**

**Nota:** al termine della giornata di lavoro, smaltire il materiale di scarto liquido e le soluzioni residue e verificare che non vi siano polveri o perdite sulla stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 (vedere l'Appendice B, pagina 48).
- 17. Riscaldare la piastra PyroMark Q24 contenente i campioni a 80°C per 2 minuti utilizzando il portapiastre PyroMark Q24 preriscaldato.**
- 18. Rimuovere la piastra PyroMark Q24 dal portapiastre caldo e posizionarla su un secondo portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C), lasciando raffreddare i campioni a temperatura ambiente per 10-15 minuti.**
- 19. Passare alla procedura "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 28.**

## Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24

Questo protocollo descrive la preparazione e il caricamento dei reagenti PyroMark Gold Q24 sulla cartuccia PyroMark Q24 e l'esecuzione di un processo completo sullo strumento PyroMark Q24. Per informazioni dettagliate sulla configurazione di un processo, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

### Punti importanti prima di iniziare

- Il report "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione), disponibile nel menu "Tools" (Strumenti) durante la configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 16), contiene informazioni relativamente ai volumi dei nucleotidi, del tampone enzimatico e del tampone di substrato che sono necessari per un processo specifico.

### Prima di iniziare

- Accendere il sistema PyroMark Q24. L'interruttore di alimentazione si trova sul retro dello strumento.

### Procedura

- 1. Sciogliere le miscele enzimatiche e di substrato liofilizzate in 620 µl di acqua ognuna (H<sub>2</sub>O, inclusa nel kit).**
- 2. Miscelare agitando delicatamente la fiala con un movimento rotatorio.**

Non agitare in vortex.

Per verificare che la miscela si sia completamente sciolta, lasciarla riposare a temperatura ambiente (15-25°C) per 5-10 minuti. Prima di riempire la cartuccia PyroMark Q24, assicurarsi che la soluzione non sia torbida. Se i reagenti non devono essere utilizzati immediatamente, conservare le fiale in ghiaccio\* o in frigorifero.

- 3. Attendere che i reagenti e la cartuccia PyroMark Q24 raggiungano la temperatura ambiente (20-25°C).**
- 4. Posizionare la cartuccia PyroMark Q24 con l'etichetta rivolta verso l'operatore.**

\* Durante la manipolazione di sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza dei materiali (Safety Data Sheets, MSDS), disponibili presso il fornitore del prodotto.

**5. Caricare la cartuccia PyroMark Q24 con i volumi appropriati di nucleotidi, miscela enzimatica e miscela di substrato (Figura 4).**

Assicurarsi che non vengano trasferite bolle d'aria dalla pipetta alla cartuccia.



**Figura 4. Illustrazione della cartuccia PyroMark Q24 vista dall'alto.** Le annotazioni corrispondono all'etichetta sulle fiale dei reagenti. Aggiungere la miscela enzimatica (E), la miscela di substrato (S) e i nucleotidi (A, T, C, G) rispettando i volumi indicati nel report "Pre Run-Information" (Informazioni pre-elaborazione), disponibile nel menu "Tools" (Strumenti) durante la configurazione del processo.

**6. Aprire lo sportellino della cartuccia e inserire la cartuccia reagenti piena con l'etichetta rivolta verso l'esterno. Spingere la cartuccia completamente verso l'interno e poi verso il basso.**

**7. Verificare che la linea sul lato anteriore della cartuccia sia visibile, quindi chiudere lo sportellino.**

**8. Aprire il telaio portapietra e posizionare la piastra sul blocco riscaldante.**

**9. Chiudere il telaio portapietra e il coperchio dello strumento.**

**10. Inserire la penna USB (contenente il file del processo) nella porta USB sul lato anteriore dello strumento.**

Non rimuovere la penna USB prima che il processo sia terminato.

**11. Selezionare "Run" (Elabora) nel menu principale (utilizzare i pulsanti ▲ e ▼ dello schermo), quindi premere "OK".**

**12. Selezionare il file del processo utilizzando i pulsanti ▲ e ▼ dello schermo.**

Per visualizzare il contenuto di una cartella, selezionare la cartella desiderata e premere "Select" (Seleziona). Per tornare alla vista precedente, premere "Back" (Indietro).

**13. Dopo avere selezionato il file del processo, premere "Select" (Seleziona) per avviare l'elaborazione.**

**14. Quando il processo è terminato e lo strumento conferma che il file del processo è stato salvato sulla penna USB, premere "Close" (Chiudi).**

**15. Rimuovere la penna USB.**

**16. Aprire il coperchio dello strumento.**

- 17. Aprire lo sportellino della cartuccia e rimuovere la cartuccia reagenti sollevandola e tirando verso l'esterno.**
- 18. Chiudere lo sportellino.**
- 19. Aprire il telaio portapiastra e rimuovere la piastra dal blocco riscaldante.**
- 20. Chiudere il telaio portapiastra e il coperchio dello strumento.**
- 21. Smaltire la piastra e pulire la cartuccia seguendo le istruzioni contenute nel foglio illustrativo allegato alla cartuccia.**
- 22. Analizzare il processo in base alla procedura "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 31.**

## Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24

Questo protocollo descrive l'analisi della metilazione di un processo *therascreen* MGMT completo eseguito con il software PyroMark Q24.

### Procedura

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.
2. Utilizzando Windows Explorer (Esplora risorse), spostare il file del processo dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.
3. Aprire il file del processo nella modalità CpG del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.
4. Per analizzare il processo e visualizzare un riepilogo generale dei risultati, fare clic su uno dei pulsanti "Analyze" (Analizza).



Analizzare tutti i pozzetti.



Analizzare il pozzetto selezionato.

I risultati dell'analisi (frequenze di metilazione) e la valutazione della qualità vengono visualizzati sopra la posizione della variabile nel tracciato Pyrogram<sup>®</sup>. Per maggiori dettagli su come analizzare un processo, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

5. Per generare un report, nel menu "Reports" selezionare "CpG Full Report" (Report completo CpG) oppure "CpG Analysis Results" (Risultati analisi CpG).

**Nota:** per ottenere risultati attendibili, è consigliabile utilizzare altezze del picco singolo superiori a 30 RLU. Nella configurazione dei dosaggi impostare 30 RLU come "required peak height for passed quality" (altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato). Vedere l'Appendice A, pagina 47, e il manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

**Nota:** per documentare e interpretare la quantificazione di metilazione è opportuno utilizzare il report "CpG Analysis Results" (Risultati analisi CpG). I numeri riportati sul pirogramma sono arrotondati e non mostrano l'esatta quantificazione.

**Nota:** è necessario confrontare sempre il pirogramma con l'istogramma (per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma). I picchi misurati devono corrispondere all'altezza delle barre dell'istogramma.

## Interpretazione dei risultati

Per poter effettuare un confronto, è consigliabile includere in ogni processo un campione ematico di DNA ottenuto da un donatore sano.

Il controllo della conversione con bisolfito (indicato da una barra gialla nella finestra del pirogramma) indica quando la conversione è completa. Un segnale nel controllo della conversione con bisolfito potrebbe essere indicativo di una conversione incompleta; questa circostanza può comportare una quantificazione falsata della metilazione e generare un'avvertenza.

I valori del limite del bianco (Limit of blank, LOB) rappresentano le frequenze di metilazione ottenute da campioni ematici di donatori sani con una probabilità del 95% (vedere la Tabella 8 e "Caratteristiche prestazionali", pagina 38).

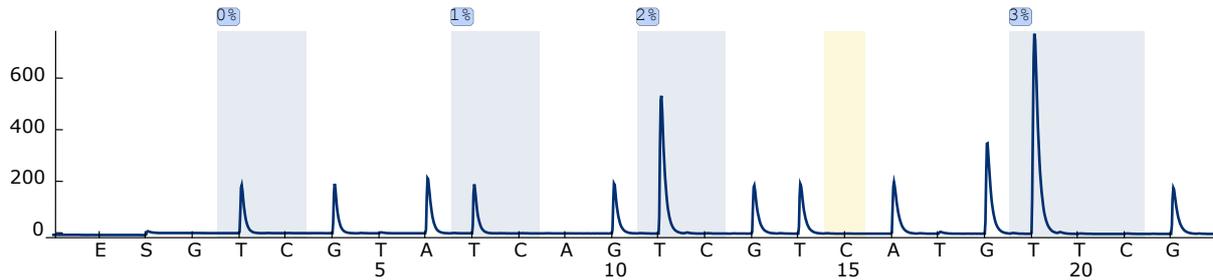
**Tabella 8. Valori LOB determinati per siti di metilazione specifici usando campioni ematici di donatori sani**

Posizione	LOB (unità %)
Sito CpG 1	1,5
Sito CpG 2	1,8
Sito CpG 3	3,2
Sito CpG 4	3,4
Media dei siti CpG 1-4	2,1

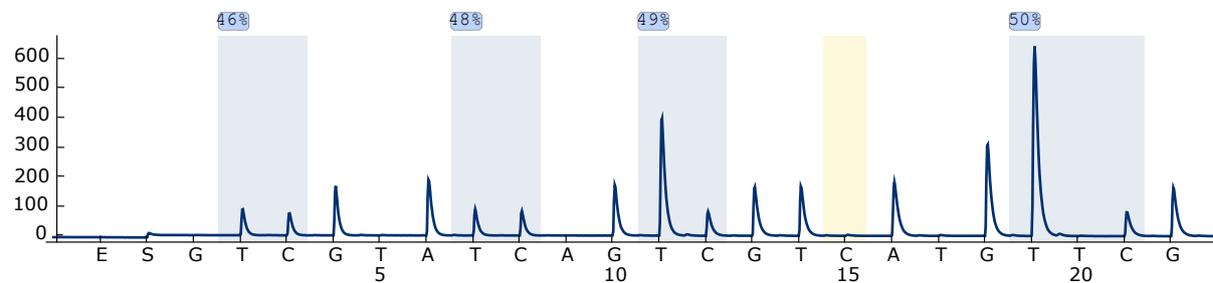
**Nota:** questi valori si basano sui processi nei quali è stato registrato un segnale di oltre 30 RLU (unità di luce relative), come normalmente si ottiene da 10 ng di DNA isolato da sangue (misurato prima della conversione con bisolfito). È consigliabile confermare le prestazioni del metodo in laboratorio.

## Risultati rappresentativi

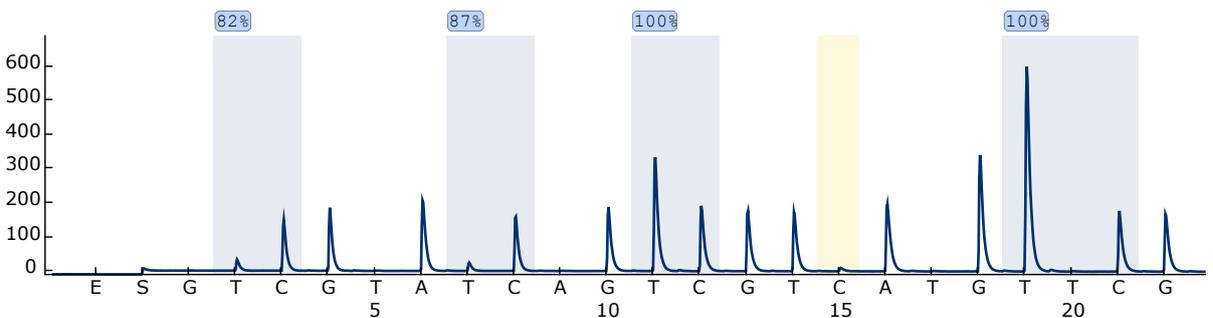
Nelle Figure 5-7 sono illustrati risultati rappresentativi dei tracciati Pyrogram.



**Figure 5. Pirogramma ottenuto dall'analisi di DNA non metilato convertito con bisolfito da un campione ematico di donatore sano.** La barra in corrispondenza della dispensazione 15 rappresenta il controllo di completezza della conversione con bisolfito.



**Figura 6. Pirogramma ottenuto dall'analisi di DNA metilato convertito con bisolfito.** La barra in corrispondenza della dispensazione 15 rappresenta il controllo di completezza della conversione con bisolfito.



**Figura 7. Pirogramma ottenuto dall'analisi di DNA altamente metilato convertito con bisolfito (DNA di controllo metilato, fornito).** La barra in corrispondenza della dispensazione 15 rappresenta il controllo di completezza della conversione con bisolfito.

## Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli esperti del supporto tecnico QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante le informazioni e i protocolli descritti in questo manuale o le tecnologie relative a campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Nota:** per risolvere i problemi generali dello strumento, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

### Commenti e suggerimenti

---

#### Segnali nel controllo senza templatato (controllo negativo)

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| a) Interferenza tra pozzetti | Il segnale da un pozzetto viene rilevato in un pozzetto vicino. Evitare di posizionare i campioni con un segnale ad alta intensità vicino ai pozzetti contenenti i controlli senza templatato.      |
| b) Contaminazione della PCR  | Utilizzare puntali per pipette sterili e dotati di filtri. La conservazione e l'estrazione di materiali come campioni, controlli e ampliconi deve avvenire in luoghi separati dai reagenti per PCR. |

#### Sequenza scarsa o inattesa

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| a) Bassa qualità del DNA genomico | Un DNA genomico di scarsa qualità può determinare il fallimento della PCR. Analizzare i campioni della PCR applicando una tecnica elettroforetica (ad esempio, sistema QIAxcel® o elettroforesi su gel di agarosio). |
|-----------------------------------|--|

## Commenti e suggerimenti

---

### Risultato "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato)

- a) Altezza del picco bassa    Eventuali errori di gestione relativi all'allestimento PCR o alla preparazione del campione prima della procedura di pirosequenziamento possono causare picchi bassi.
- È importante che i campioni siano aspirati completamente dallo strumento del vuoto. Assicurarsi che lo strumento del vuoto venga abbassato lentamente nei campioni e che la geometria della piastra per PCR (o delle strisce) usate per l'immobilizzazione consenta l'aspirazione completa dei campioni.
- Eeguire il test funzionale delle sonde del filtro in base alle istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*, rispettando scadenze regolari e sostituendo le sonde del filtro se necessario.
- In presenza di un'avvertenza "Check" (Controllare), confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma; per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra del pirogramma. Se i picchi misurati corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma, il risultato è valido. In caso contrario, è consigliabile analizzare nuovamente il campione.

## Commenti e suggerimenti

---

- b) Viene visualizzato il messaggio di avvertenza "Uncertain/Failed bisulfite conversion at dispensation: 15" (Conversione con bisolfito incerta/non riuscita in corrispondenza della dispensazione 15)
- Verificare che i valori "Allowed percentage for passed quality" (Percentuale consentita per per controllo di qualità superato) e "Allowed percentage for check quality" (Percentuale consentita per qualità da controllare) siano impostati rispettivamente su 7,0 e 10,0.
- Nota:** nel caso di una valutazione della qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato), la conversione con bisolfito non è stata completata e questa circostanza potrebbe compromettere la quantificazione della metilazione.
- È consigliabile utilizzare i kit EpiTect Bisulfite (n° di cat. 59104), EpiTect Plus FFPE Bisulfite (n° di cat. 59144) o EpiTect Plus DNA Bisulfite (n° di cat. 59124) di QIAGEN e seguire rigorosamente il protocollo di conversione.

### Fondo elevato

- a) Conservazione impropria dei nucleotidi
- Conservare i nucleotidi a 2-8°C. La conservazione tra -10 e -25°C può determinare un aumento del fondo.
- b) Abbreviazione del tempo di raffreddamento dei campioni prima dell'analisi di pirosequenziamento
- Conservare i campioni su un portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente per 10-15 minuti. Non abbreviare il tempo di raffreddamento.
- c) Contaminazione della cartuccia
- Pulire accuratamente la cartuccia rispettando le istruzioni fornite nel foglio illustrativo del prodotto. Conservare la cartuccia al riparo da luce e polvere.

## Commenti e suggerimenti

---

### Nessun segnale nei controlli positivi

- |   |  |
|---|--|
| a) Miscela enzimatica o di substrato insufficiente per tutti i pozzetti | Assicurarsi di riempire la cartuccia PyroMark Q24 in base alle informazioni di pre-elaborazione ("Pre Run Information", menu "Tools").   |
| b) Conservazione o diluizione errata dei reagenti                       | Preparare i reagenti <i>therascreen</i> in base alle istruzioni contenute nella sezione "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 28.  |
| c) Errore relativo alla PCR o alla preparazione del campione            | Eventuali errori di gestione relativi alla configurazione, alla programmazione del ciclatore PCR o alla preparazione del campione prima dell'analisi di pirosequenziamento possono determinare l'assenza di segnale. Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro seguendo le istruzioni fornite nel manuale utente <i>PyroMark Q24 User Manual</i> e sostituire le sonde del filtro quando indicato. Ripetere la PCR e l'analisi di pirosequenziamento. |

## Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto del kit *therascreen MGMT Pyro* è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto.

## Limitazioni

Tutti i risultati diagnostici che verranno generati dovranno essere interpretati unitamente ad altre rilevazioni cliniche o di laboratorio.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

## Caratteristiche prestazionali

### Limite del bianco

Si è proceduto alla determinazione del limite del bianco (LOB, Tabella 9) per i quattro siti CpG analizzati con il kit *therascreen* MGMT Pyro usando campioni ematici di DNA ottenuti da donatori sani nel rispetto delle istruzioni contenute nel documento di indirizzo del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) intitolato Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline". Gli errori  $\alpha$  e  $\beta$  (rispettivamente falsi positivi e falsi negativi) sono stati impostati sul 5%.

I valori LOB rappresentano le frequenze di metilazione ottenute da campioni ematici di donatori sani con una probabilità del 95%.

**Tabella 9. Valori LOB determinati per siti di metilazione specifici usando campioni ematici di donatori sani**

Posizione	LOB (unità %)
Sito CpG 1	1,5
Sito CpG 2	1,8
Sito CpG 3	3,2
Sito CpG 4	3,4
Media dei siti CpG 1-4	2,1

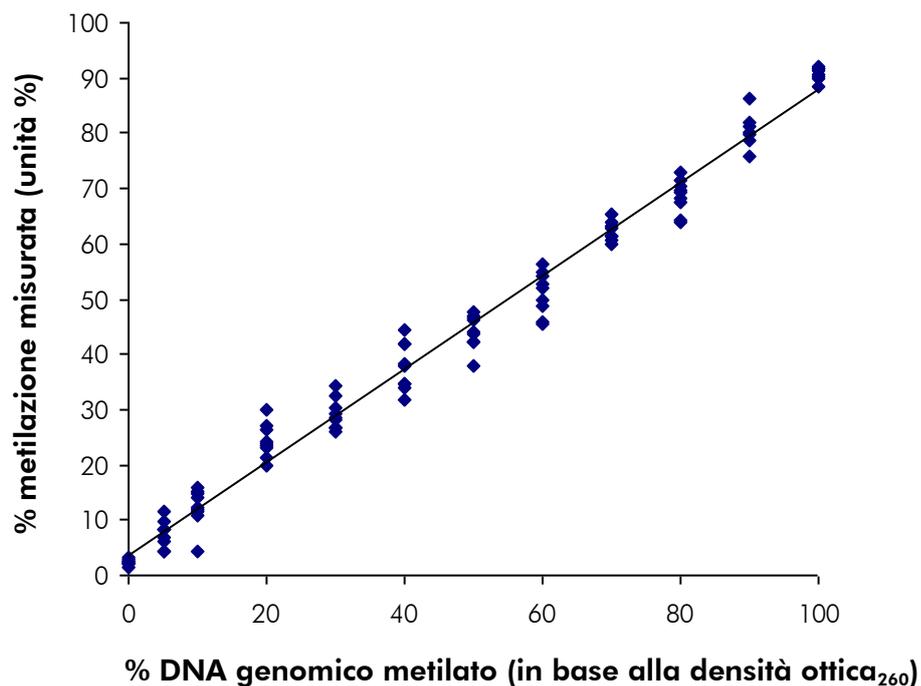
**Nota:** è consigliabile confermare le prestazioni del metodo in laboratorio.

### Linearità

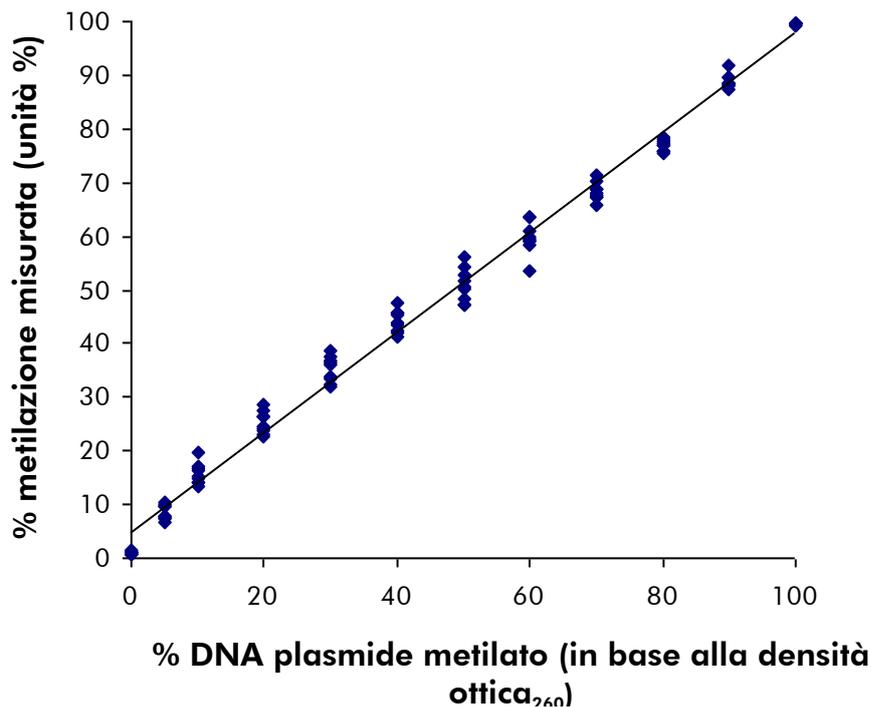
La linearità è stata determinata usando miscele di DNA genomico metilato e non metilato convertito con bisolfito ottenuto dal set EpiTect PCR Control DNA (n° di cat. 59104) e parallelamente usando miscele di plasmidi contenenti la sequenza corrispondente convertita con bisolfito di campione metilato o non metilato (ad esempio, contenente rispettivamente i nucleotidi C e T nei siti CpG). I DNA genomici e i plasmidi sono stati miscelati rispettivamente in proporzioni per dare luogo a dodici livelli di metilazione (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Ogni miscela è stata analizzata con tre diversi lotti del kit *therascreen* MGMT Pyro in tre processi di pirosequenziamento ripetuti tre volte ciascuno.

I risultati (n=9 per ogni livello di metilazione) sono stati analizzati in base alle indicazioni del documento di indirizzo EP6-A del CLSI intitolato "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" usando il software Analyse-it® v2.21 (Analyse-it Software, Ltd., UK) e sono riportati nelle Figure 8 e 9 per la metilazione media dei siti CpG 1-4 usando rispettivamente DNA genomico o plasmide come templati.

I risultati sono stati lineari, con una non linearità ammissibile di 5 unità % nell'intervallo analizzato del livello di metilazione (compreso tra 0 e 100%) per ogni sito di metilazione e per la media dei quattro siti.



**Figura 8. Linearità della metilazione media dei siti CpG 1-4 con miscele di DNA di controllo Epitect.**



**Figura 9. Linearità della metilazione media dei siti CpG 1-4 con miscele di DNA plasmide.**

## Precisione

I dati relativi alla precisione consentono di determinare la variabilità totale del dosaggio e sono stati ottenuti a tre livelli differenti attraverso l'analisi delle miscele di DNA genomico e plasmide descritte in precedenza replicate tre volte ciascuna.

La ripetibilità (variabilità intra-dosaggio e tra batch) è stata calcolata a partire dai dati per la determinazione della linearità (tre processi nello stesso giorno con lotti diversi del kit *therascreen MGMT Pyro*). La precisione intermedia (variabilità intra-laboratorio) è stata determinata in tre processi eseguiti nello stesso laboratorio in tre giorni di lavoro con differenti operatori, strumenti PyroMark Q24 e lotti del kit *therascreen MGMT Pyro*. La riproducibilità (variabilità tra laboratori) è stata calcolata sulla base di due processi in un laboratorio interno e due processi in un laboratorio esterno, eseguiti con lotti differenti del kit *therascreen MGMT Pyro*.

Le stime relative alla precisione sono espresse come deviazione standard delle frequenze di metilazione media nei siti CpG 1-4 misurate in unità % (Tabelle 10 e 11). La ripetibilità, la precisione intermedia e la riproducibilità con le miscele di DNA genomico sono state rispettivamente di 0,5-4,3, 0,4-4,0 e 0,4-4,4 unità %, nell'intervallo misurato 0-100% relativo al livello di metilazione. Risultati analoghi sono stati ottenuti per le miscele di DNA plasmide (vedere la Tabella 11).

**Tabella 10. Precisione della metilazione media dei siti CpG 1-4 con miscele di DNA di controllo EpiTect\***

% DNA di controllo metilato EpiTect <sup>†</sup>	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	DS <sup>‡</sup>	Media	DS	Media	DS
0	2,4	0,5	2,2	0,4	2,6	0,7
5	7,1	2,7	7,7	2,5	9,3	3,9
10	12,8	2,2	12,9	2,3	15,3	3,3
20	23,7	2,3	23,6	2,2	24,2	2,6
30	29,8	2,6	31,0	2,6	30,4	3,0
40	36,7	3,3	37,0	3,6	38,1	3,7
50	44,1	2,9	44,8	3,6	44,2	2,7
60	51,3	3,6	52,4	3,5	51,2	3,3
70	62,3	1,9	62,8	2,1	61,2	2,9
80	68,6	3,1	69,4	3,1	66,9	3,4
90	80,6	3,3	79,5	2,2	77,0	4,3
100	90,8	1,2	91,7	2,1	90,0	1,9

\* Tutti i valori sono espressi in unità %.

<sup>†</sup> In base alla lettura della densità ottica<sub>260</sub>.

<sup>‡</sup> DS: deviazione standard (n=9 per ripetibilità e precisione intermedia, n=12 per riproducibilità).

**Tabella 11. Precisione della metilazione media dei siti CpG 1-4 con miscele di DNA plasmide\***

Miscela di DNA plasmide (%) <sup>†</sup>	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	DS <sup>‡</sup>	Media	DS	Media	DS
0	1,1	0,2	1,0	0,1	1,1	0,3
5	8,6	1,4	8,3	1,1	10,2	3,0
10	15,7	1,9	15,1	2,8	18,8	3,2
20	25,3	2,1	25,5	3,1	28,4	3,6
30	35,2	2,3	34,3	3,2	36,2	2,5
40	44,1	2,0	43,7	3,3	42,8	2,4
50	50,3	3,2	51,8	2,9	52,1	2,5
60	60,2	2,2	60,9	2,8	59,3	2,3
70	68,4	1,7	68,7	1,5	66,9	2,7
80	76,9	1,1	77,4	0,8	75,7	2,1
90	88,9	1,3	88,8	1,7	85,1	4,6
100	99,5	0,1	99,5	0,2	99,0	0,8

\* Tutti i valori sono espressi in unità %.

<sup>†</sup> In base alla lettura della densità ottica<sub>260</sub>. I valori 0-100% indicano la proporzione di plasmide contenente i nucleotidi C nei siti CpG (che rappresentano i nucleotidi C metilati) in una miscela di plasmide contenente i nucleotidi T nei siti CpG (che rappresentano i nucleotidi C non metilati).

<sup>‡</sup> DS: deviazione standard (n=9 per ripetibilità e precisione intermedia, n=12 per riproducibilità).

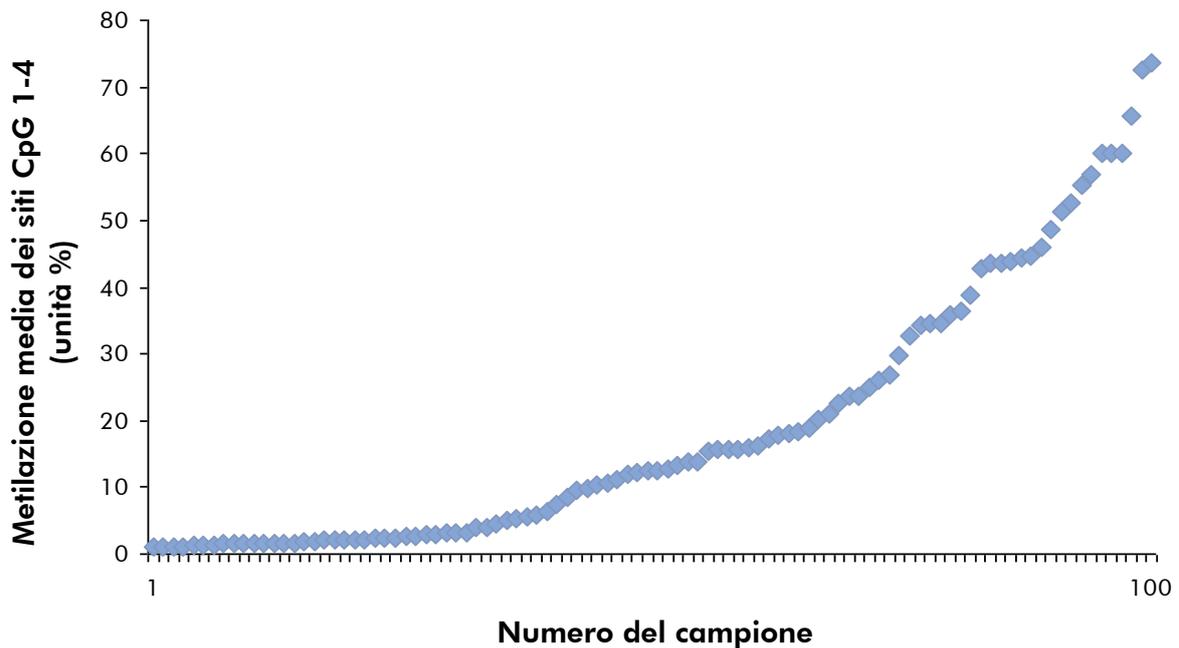
## Valutazione diagnostica

È stata eseguita una valutazione del kit *therascreen* MGMT Pyro rispetto al sequenziamento di Sanger. È stato estratto il DNA da 100 campioni tumorali FFPE di glioblastoma ed è stata individuata la metilazione nei quattro siti CpG analizzati con il kit *therascreen* MGMT Pyro.

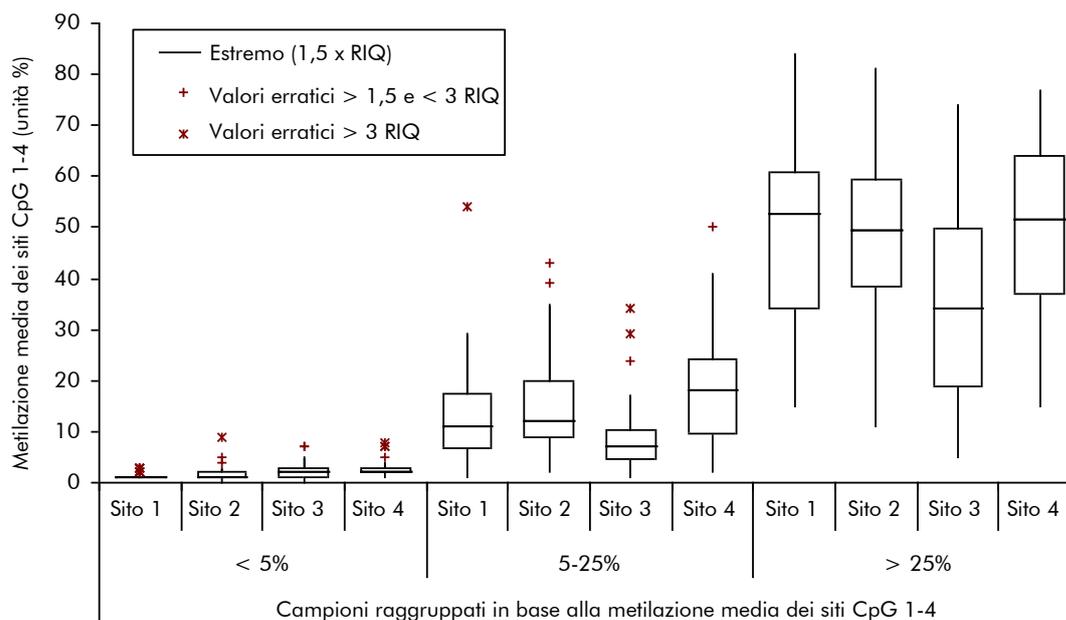
Il DNA è stato isolato con il kit QIAamp DNA FFPE Tissue e convertito con bisolfito con il kit Epiect Bisulfite. L'analisi di pirosequenziamento è stata eseguita con il kit *therascreen* MGMT Pyro sullo strumento PyroMark Q24; il

sequenziamento di Sanger è stato eseguito sul sistema ABI™ 3130 Genetic Analyzer.

Con il sequenziamento di Sanger è stato possibile determinare lo stato di metilazione in 49 campioni su un totale di 100 campioni analizzati, mentre con il kit *therascreen* MGMT Pyro è stato possibile determinare il livello di metilazione in tutti i campioni. Sono stati rilevati livelli di metilazione media tra 1 e 74 unità % nei 100 campioni sottoposti all'analisi di pirosequenziamento (Figura 10). La distribuzione dei livelli di metilazione per i singoli siti è illustrata nella Figura 11.



**Figura 10. Metilazione media dei siti CpG 1-4 ottenuta da 100 campioni di glioblastoma analizzati con il kit *therascreen* MGMT Pyro. I campioni sono ordinati per livello di metilazione crescente.**



**Figura 11. Distribuzione della metilazione dei singoli siti CpG in 100 campioni di glioblastoma analizzati con il kit *therascreen* MGMT Pyro.** I campioni sono raggruppati in base alla metilazione media dei siti CpG 1-4. Le caselle rappresentano i quartili superiore e inferiore (25° e 75° percentile) separati dalla mediana (50° percentile, rappresentato come riga orizzontale). I dati che non rientrano in questo intervallo sono riportati come Estremi o Valori erratici, come indicato nella legenda del grafico. RIQ: Range interquartile.

Per il confronto tra i metodi, ai risultati dell'analisi di pirosequenziamento è stato assegnato uno stato metilato o non metilato utilizzando come cutoff la metilazione media in 5 unità % dei siti CpG 1-4, mentre ai risultati del sequenziamento di Sanger è stato assegnato manualmente lo stato metilato o non metilato.

Con il sequenziamento di Sanger sono stati rilevati trentadue campioni metilati. In tutti i casi è stato possibile riprodurre lo stato di metilazione con il kit *therascreen* MGMT Pyro. Con il pirosequenziamento sono stati identificati due campioni metilati in più, la cui metilazione non era stata rilevata dal sequenziamento di Sanger. Su 19 campioni non metilati rilevati dal sequenziamento di Sanger, 17 campioni hanno prodotto lo stesso risultato con il kit *therascreen* MGMT Pyro. I risultati sono illustrati nella Tabella 12.

Escludendo i campioni che non hanno superato il sequenziamento di Sanger, la concordanza dei risultati tra il kit *therascreen* MGMT Pyro e il sequenziamento di Sanger è stata del 96% (Tabella 12).

**Tabella 12. Risultati dell'analisi della metilazione nei siti CpG 1-4 per i campioni di glioblastoma analizzati**

		Sequenziamento di Sanger			
		Non metilati	Metilati	Sconosciuti	Totale
Kit <i>therascreen</i> MGMT Pyro	Non metilati	17	0	18	<b>35</b>
	Metilati	2	32	31	<b>65</b>
	Sconosciuti	0	0	0	<b>0</b>
	Totale	<b>19</b>	<b>32</b>	<b>49</b>	<b>100</b>

**Nota:** in tutti i processi utilizzati per la determinazione delle caratteristiche prestazionali, il segnale ottenuto è stato superiore a 30 RLU, come di regola avviene con 10 ng di DNA isolato da sangue (misurazione effettuata prima della conversione con bisolfito).

## Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online che viene continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il QIAGEN Reference Database all'indirizzo [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) o contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

## Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Utilizzare entro



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Codice del lotto



Numero di materiale



Componenti



Contenuto



Numero



Idrossido di sodio



Global Trade Item Number



Limiti di temperatura



Produttore



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale

## Indirizzi utili

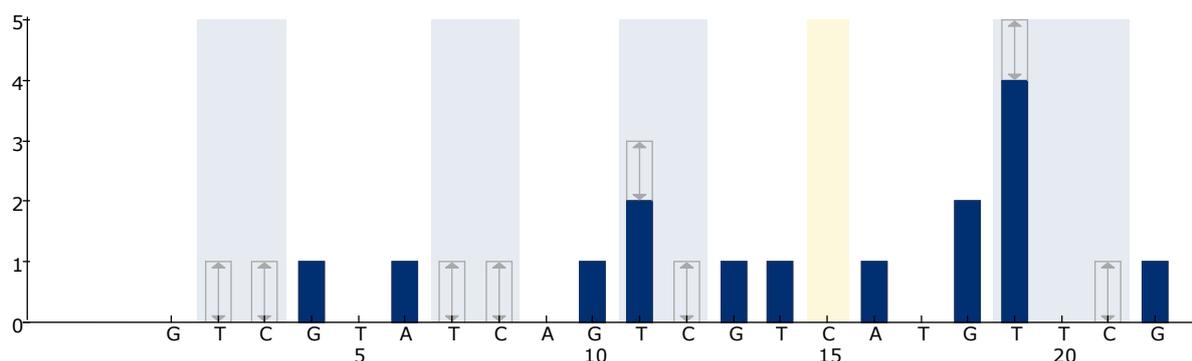
Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di assistenza tecnica [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) o chiamate uno dei reparti del servizio tecnico di QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Appendice A: configurazione del dosaggio MGMT

Prima di eseguire il dosaggio MGMT per la prima volta, è necessario configurare il file del dosaggio utilizzando il software PyroMark Q24, come descritto di seguito.

### Procedura

1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New CpG Assay" (Nuovo dosaggio CpG).
2. Digitare nel campo "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare) la sequenza:  
**YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT**
3. Immettere manualmente il seguente "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione):  
**GTCGTATCAGTCGTCATGTTCCG**
4. Fare clic sulla scheda "Analysis Parameters" (Parametri di analisi), quindi aumentare fino a 30 il valore "Peak Height Threshold - Required peak height for Passed quality:" (Soglia altezza di picco - Altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato).
5. Nella scheda "Analysis Parameters" (Parametri di analisi) impostare i valori di "Allowed percentage for passed quality" (Percentuale consentita per controllo di qualità superato) e "Allowed percentage for check quality" (Percentuale consentita per qualità da controllare) rispettivamente su 7,0 e 10,0.
6. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi salvare il dosaggio come "MGMT".



**Figura 12. Istogramma del dosaggio MGMT.** La barra in corrispondenza della dispensazione 15 rappresenta il controllo di completezza della conversione con bisolfito.

## Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti

<b>AVVERTENZA</b> 	<b>Agenti chimici pericolosi</b> <p>La soluzione di denaturazione utilizzata con la stazione di lavoro per il vuoto contiene idrossido di sodio, che è irritante per occhi e cute.</p> <p>Indossare sempre occhiali protettivi, guanti e un camice da laboratorio.</p> <p>L'ente responsabile (ad esempio, il direttore del laboratorio) deve adottare tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), come definito nelle schede tecniche di sicurezza dei materiali (Material Safety Data Sheets, SDS) o nei documenti OSHA*, ACGIH† o COSHH‡ pertinenti.</p> <p>Lo sfiato dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti e le leggi su salute e sicurezza vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	---

\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Stati Uniti d'America)

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Stati Uniti d'America)

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Regno Unito)

Verificare il rispetto di tutti i regolamenti e le leggi in vigore a livello nazionale, statale e locale per quanto riguarda lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

### Punti importanti prima di iniziare

- Questo protocollo richiede l'uso di acqua altamente depurata.

### Procedura

- B1. Assicurarsi che non sia applicato il vuoto allo strumento del vuoto. Assicurarsi che lo strumento del vuoto sia chiuso (Off) e che la pompa del vuoto sia spenta.**
- B2. Gettare via tutte le soluzioni residue nei recipienti.**
- B3. Sciacquare i recipienti con acqua altamente depurata, oppure sostituirli se necessario.**
- B4. Svuotare il contenitore del materiale di scarto.**
- B5. È possibile rimuovere il tappo senza scollegare il tubo.**

**B6. Se è necessario pulire la stazione di lavoro per il vuoto (ad esempio, per la presenza di polvere o perdite), seguire le istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.**

## Informazioni per gli ordini

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>N° di catalogo</b>
<i>therascreen</i> MGMT Pyro Kit (48)	Per 48 reazioni sui sistemi PyroMark Q24: primer di sequenziamento, primer per PCR, DNA di controllo metilato, soluzione Master Mix per PCR PyroMark, concentrato CoralLoad, tampone di legame PyroMark, tampone di annealing PyroMark, soluzione di denaturazione PyroMark, tampone di lavaggio PyroMark, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP e H <sub>2</sub> O	971061
<b>Accessori</b>		
PyroMark Q24 Plate (100)	Piastra di reazione a 24 pozzetti per sequenziamento	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartucce per la dispensazione di nucleotidi e reagenti	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sonde dei filtri riutilizzabili per le stazioni del vuoto PyroMark Q96 e Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Per controllare l'installazione del sistema	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Per convalidare le prestazioni del sistema	979304
<b>Prodotti correlati</b>		
PyroMark Q24 MDx	Piattaforma di rilevazione basata sulle sequenze per sottoporre a pirosequenziamento 24 campioni in parallelo	9001513
PyroMark Q24	Piattaforma di rilevazione basata sulle sequenze per sottoporre a pirosequenziamento 24 campioni in parallelo	9001514

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>N° di catalogo</b>
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto (220 V) per preparare 24 campioni in parallelo, dal prodotto della PCR al template a filamento singolo	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto (220 V) per preparare 24 campioni in parallelo, dal prodotto della PCR al template a filamento singolo	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Software applicativo	9019063
PyroMark Q24 Software	Software di analisi	9019062
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 colonne QIAamp MinElute®, proteinasi K, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Per 48 preparazioni: cartucce reagenti (tessuto), puntali per filtri monouso, supporti portapuntali monouso, provette per campioni (2 ml), provette di eluizione (1,5 ml), tampone G2, proteinasi K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Per 50 preparazioni: colonne QIAamp Mini Spin, tamponi, reagenti, provette, VacConnector	61104
EpiTect Bisulfite Kit	Per 48 preparazioni: colonne EpiTect Bisulfite Spin, miscela di reazione, tampone di protezione del DNA, RNA Carrier, tamponi	59104

\* Solo Regno Unito.

† Resto del mondo.

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>N° di catalogo</b>
EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit	Per 48 preparazioni: colonne MinElute DNA Spin, miscela di bisolfito, tampone di protezione del DNA, RNA carrier, tamponi, soluzione di deparaffinazione, tampone di lisi FTB	59144
EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit	Per 48 preparazioni: colonne MinElute DNA Spin, miscela di bisolfito, tampone di protezione del DNA, RNA carrier, tamponi	59124
EpiTect PCR Control DNA Set (100)	Set di DNA umano di controllo (contenente sia DNA metilato e non metilato convertito con bisolfito, sia DNA non metilato e non convertito) per 100 reazioni PCR di controllo	59695

Per le informazioni di licenza aggiornate e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EpiTect®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ABI™ (Life Technologies); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd., UK); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Florida Scientific Services, Inc.); Windows® (Microsoft Corporation).

### **Contratto di licenza limitata**

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del kit *therascreen* MGMT Pyro l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il kit *therascreen* MGMT Pyro può essere utilizzato esclusivamente in conformità al *Manuale del kit theascreen MGMT Pyro* e solo con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per quanto dichiarato nel *Manuale del kit theascreen MGMT Pyro* e per i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo Kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terze parti.
3. Questo Kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del Kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo Kit e/o ai relativi componenti.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Brazil** ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

**Italy** ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

