

Maggio 2016

Manuale del kit *therascreen*[®] RAS Extension Pyro[®] Kit



Versione 1

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per la rilevazione delle mutazioni negli esoni 3 e 4 dell'oncogene KRAS umano e negli esoni 2, 3 e 4 dell'oncogene NRAS umano



REF

971590



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R2 **MAT** 1085873IT



Indice generale

Uso previsto	5
Riassunto e spiegazione	5
Principio della procedura	7
Controlli	8
Materiale fornito.....	9
Contenuto del kit	9
Materiale necessario ma non fornito	12
Avvertenze e precauzioni	15
Precauzioni generali.....	15
Conservazione e gestione dei reagenti.....	16
Raccolta dei campioni, preparazione per l'analisi e conservazione.....	17
Procedura	19
Isolamento del DNA	19
Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24	19
Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti per PCR inclusi nel kit theascreen RAS Extension Pyro.....	22
Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance.....	25
Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi Pyrosequencing sul sistema PyroMark Q24	27
Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24	32
Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24.....	35
Interpretazione dei risultati.....	40

Interpretazione dei risultati dell'analisi e rilevazione delle mutazioni di basso livello	40
Guida alla risoluzione dei problemi	48
Controllo di qualità	50
Limitazioni	50
Caratteristiche prestazionali	51
Limite del bianco e limite di sensibilità	51
Mutazioni GGT > TGT e GGT > GTT nel codone 13 NRAS.....	53
Linearità	54
Precisione.....	55
Valutazione diagnostica.....	58
Riferimenti bibliografici	62
Simboli.....	63
Indirizzi utili	64
Appendice A: configurazione dei dosaggi <i>therascreen</i> RAS Extension Pyro.....	65
Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti.....	71
Informazioni per gli ordini	73

Uso previsto

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è un test diagnostico in vitro basato sulla tecnologia Pyrosequencing®, destinato alla rilevazione quantitativa delle mutazioni presenti nei codoni 59, 61, 117 e 146 dell'oncogene KRAS umano e nei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 dell'oncogene NRAS umano. Utilizza DNA estratto da tessuto umano di carcinoma coloretale metastatico (metastatic colorectal cancer, mCRC) fissato in formalina e incluso in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro contribuisce all'identificazione dei pazienti mCRC che hanno maggiori probabilità di rispondere alle terapie anti-EGFR con cetuximab e panitumumab (1).

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è destinato esclusivamente all'uso sul sistema PyroMark® Q24. I sistemi PyroMark Q24 comprendono:

- Lo strumento PyroMark Q24 o PyroMark Q24 MDx.
- La stazione di lavoro del vuoto PyroMark Q24 o PyroMark Q24 MDx.
- Il software PyroMark Q24 (versione 2.0) o PyroMark Q24 MDx (versione 2.0).

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è destinato a operatori professionisti, come tecnici e medici, che conoscono le procedure diagnostiche in vitro, le tecniche di biologia molecolare e il sistema PyroMark Q24.

Riassunto e spiegazione

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro viene utilizzato per eseguire misurazioni quantitative delle mutazioni negli esoni 3 e 4 del gene KRAS umano e negli esoni 2, 3 e 4 del gene NRAS umano. Il kit è costituito da 8 dosaggi (vedere Figura 1).

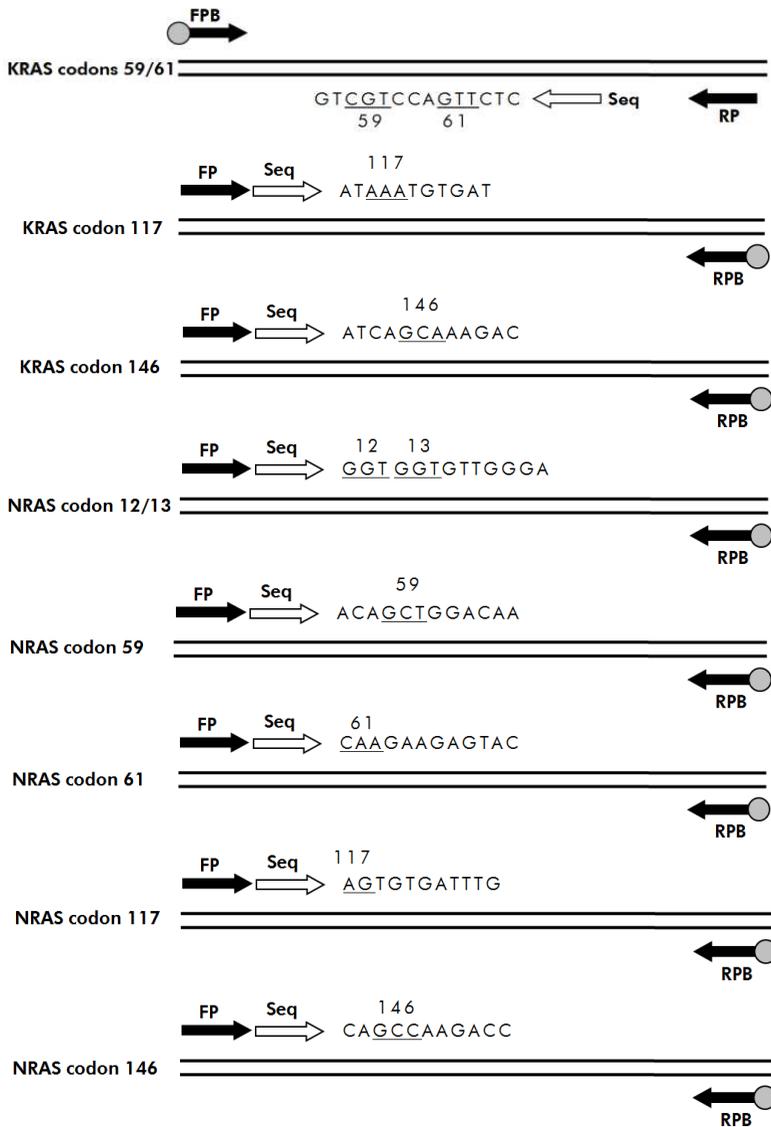


Figura 1. Dosaggi del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Le 8 regioni vengono amplificate separatamente tramite PCR e sequenziate lungo tutta la regione definita. Le mutazioni nella regione di interesse genereranno pattern distinti sul tracciato Pyrogram®, nettamente distinguibili dai tracciati ottenuti con i campioni wild-type. Le mutazioni che è possibile analizzare con il software PyroMark Q24 sono elencate nella Tabella 15 (Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro). I dosaggi per i codoni 117 e 146 del gene KRAS e i codoni 12/13, 59, 61, 117 e 146 del gene NRAS vengono sequenziati nella direzione diretta (forward), mentre il dosaggio per il codone 59/61 del gene KRAS viene sequenziato nella direzione inversa (reverse). Il prodotto è costituito da una miscela di primer per PCR e da un primer di sequenziamento per ogni dosaggio. I primer vengono forniti in soluzione e ogni fiala contiene 24 µl di primer o miscela di primer.

Principio della procedura

Nella Figura 2 più avanti è illustrato il flusso di lavoro della procedura di analisi. Dopo l'esecuzione della PCR, i primer vengono indirizzati sulla regione di interesse e gli ampliconi vengono immobilizzati sui grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose® High Performance). Viene preparato DNA a filamento singolo e si assiste all'annealing dei primer di sequenziamento con il DNA. A questo punto i campioni vengono analizzati sul sistema PyroMark Q24 utilizzando i file di configurazione del dosaggio e un file del processo.

È possibile correggere la sequenza da analizzare per rilevare altre mutazioni dopo il processo (vedere "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 35 e "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro", pagina 65).

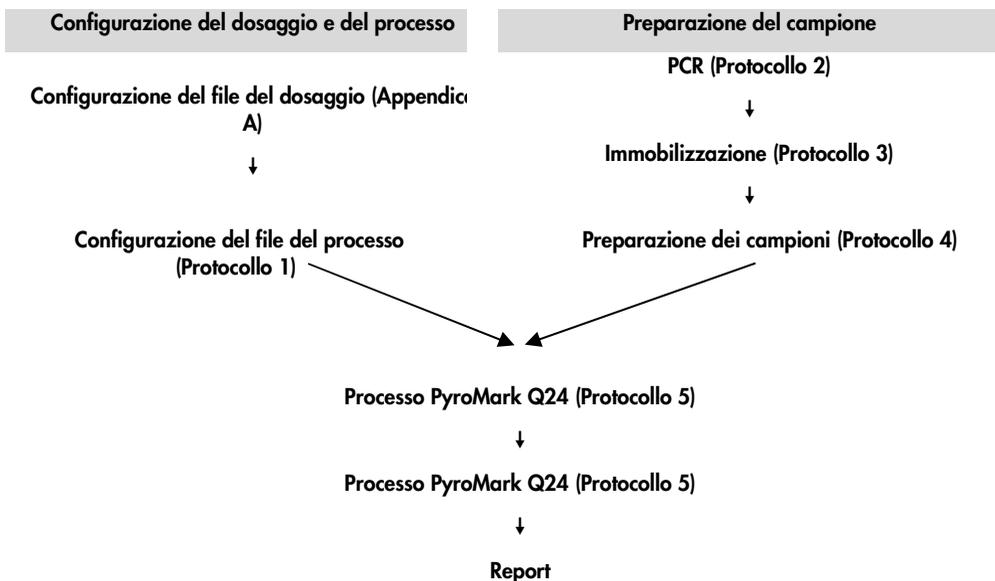


Figura 2. Flusso di lavoro della procedura del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Controlli

Il DNA di controllo non metilato è incluso nel prodotto come controllo positivo per la PCR e le reazioni di sequenziamento. Il DNA di controllo ha un genotipo wild-type nelle regioni sequenziate con questo kit. Includere un campione di DNA di controllo per ogni dosaggio in ogni processo di pirosequenziamento. Ciò è necessario se si desidera giungere ad un'interpretazione adeguata dei risultati e all'identificazione delle mutazioni di basso livello (vedere "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 35).

È inoltre necessario includere un controllo negativo (senza DNA template) in ogni configurazione PCR che preveda almeno un dosaggio.

Materiale fornito

Contenuto del kit

Scatola 1/2

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
N° di catalogo	971590
Numero di preparazioni	24
Seq Primer KRAS 59/61 (Primer di sequenziamento KRAS 59/61)	24 µl
Seq Primer KRAS 117 (Primer di sequenziamento KRAS 117)	24 µl
Seq Primer KRAS 146 (Primer di sequenziamento KRAS 146)	24 µl
Seq Primer NRAS 12/13 (Primer di sequenziamento NRAS 12/13)	24 µl
Seq Primer NRAS 59 (Primer di sequenziamento NRAS 59)	24 µl
Seq Primer NRAS 61 (Primer di sequenziamento NRAS 61)	24 µl
Seq Primer NRAS 117 (Primer di sequenziamento NRAS 117)	24 µl
Seq Primer NRAS 146 (Primer di sequenziamento NRAS 146)	24 µl
PCR Primer KRAS 59/61 (Primer per PCR KRAS 59/61)	24 µl
PCR Primer KRAS 117 (Primer per PCR KRAS 117)	24 µl
PCR Primer KRAS 146 (Primer per PCR KRAS 146)	24 µl

<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit	(24)
N° di catalogo	971590
Numero di preparazioni	24
PCR Primer NRAS 12/13 (Primer per PCR NRAS 12/13)	24 µl
PCR Primer NRAS 59 (Primer per PCR NRAS 59)	24 µl
PCR Primer NRAS 61 (Primer per PCR NRAS 61)	24 µl
PCR Primer NRAS 117 (Primer per PCR NRAS 117)	24 µl
PCR Primer NRAS 146 (Primer per PCR NRAS 146)	24 µl
PyroMark PCR Master Mix (Master Mix per PCR PyroMark), 2x	4 x 850 µl
CoralLoad® Concentrate (Concentrato CoralLoad®), 10x	1.2 ml
H ₂ O	6 x 1.9 ml
Unmethylated Control DNA (DNA di controllo non metilato), 10 ng/µl	3 x 100 µl

Scatola 2/2

Tamponi e reagenti	Volume
PyroMark Binding Buffer (Tampone di legame PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampone di appaiamento PyroMark)	2 x 10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Soluzione di denaturazione PyroMark)*	2 x 250 ml
PyroMark Wash Buffer (Tampone di lavaggio PyroMark), 10x	2 x 25 ml
Enzyme Mixture (Miscela enzimatica)	2 fiale
Substrate Mixture (Miscela di substrato)	2 fiale
dATP α S	2 x 1180 μ l
dCTP	2 x 1180 μ l
dGTP	2 x 1180 μ l
dTTP	2 x 1180 μ l
Manuale del kit <i>therascreen RAS Extension Pyro Kit Handbook</i> (Inglese)	1 pc

* Contiene idrossido di sodio.

Materiale necessario ma non fornito

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

Reagenti

- Kit di isolamento del DNA (vedere "Isolamento del DNA", pagina 19)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° cat. 17-5113-01; www.gelifesciences.com)
- Acqua altamente depurata (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm o equivalente).

Nota: il kit contiene acqua sufficiente per la PCR, l'immobilizzazione del DNA e il dissolvimento della miscela enzimatica e della miscela di substrato; è necessario reperire altra acqua altamente depurata per la diluizione del tampone di lavaggio PyroMark 10x.

- Etanolo (70%)*

Materiali di consumo

- Puntali per pipette sterili (con filtri per l'allestimento della PCR)
- Piastre per PCR a 24 pozzetti (vedere "Piastre a 24 pozzetti raccomandate", pagina 14)
- Pellicola adesiva
- PyroMark Q24 Plate (Piastra PyroMark Q24) (n° cat. 979301)†
- PyroMark Q24 Cartridge (Cartuccia PyroMark Q24) (n.° cat. 979302)†

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

† Con marchio CE-IVD, conforme 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.

Attrezzatura

- Pipette (regolabili)*
- Microcentrifuga da tavolo*
- Termociclatore* e provette idonee per PCR
- PyroMark Q24 MDx o PyroMark Q24 (n° cat. 9001513 o 9001514)*
- Stazione di lavoro del vuoto PyroMark Q24 MDx o PyroMark Q24 (n° cat. 9001515 o 9001516 o 9001518 o 9001519)*
- Miscelatore per piastre* per immobilizzazione su grani (vedere "Agitatori per piastre raccomandati", pagina 14)
- Blocco riscaldante* in grado di raggiungere 80°C

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

Agitatori per piastre raccomandati

Con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è consigliabile utilizzare gli agitatori orbitali per piastre indicati nella Tabella 1.

Tabella 1. Agitatori per piastre raccomandati per l'uso con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Produttore	Prodotto	N° di catalogo
Eppendorf	ThermoMixer® C (strumento base)	5382000031
Eppendorf	SmartBlock™ PCR 96, thermoblock for PCR plates 96	5306000006
Thermo Fisher Scientific	Variomag® Teleshake	10448791
Thermo Fisher Scientific	Variomag Monoshake	10515882

Piastre a 24 pozzetti raccomandate

Con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è consigliabile utilizzare le piastre a 24 pozzetti indicate nella Tabella 2.

Tabella 2. Piastre a 24 pozzetti raccomandate per l'uso con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Produttore	Prodotto	N° di catalogo
Thermo Fisher Scientific	Thermo-Fast PCR Plate, 24-well	AB0624
Corning	Axygen® 24 Well Polypropylene PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

Precauzioni generali

Prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni:

- I componenti di questo prodotto sono sufficienti per analizzare 24 reazioni per ciascun dosaggio.
- Utilizzare puntali per pipette sterili (con filtri per l'allestimento della PCR).
- Conservare ed estrarre il materiale positivo (campioni, controlli positivi e ampliconi) separatamente da tutti gli altri reagenti; 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 mutazionale.

Conservazione e gestione dei reagenti

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro viene consegnato in due scatole. Il contenuto della scatola 1/2 del kit *therascreen* RAS Extension Pyro viene conservato in ghiaccio secco durante la spedizione. Subito dopo la consegna, conservare i reagenti Master Mix per PCR PyroMark, concentrato CoralLoad, DNA di controllo non metilato e tutti i primer a una temperatura compresa tra -15 e -25°C.

Il contenuto della scatola 2/2 dei tamponi e dei reagenti Pyro (tamponi, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATPaS, dCTP, dGTP e dTTP, in altre parole i reagenti per l'analisi Pyrosequencing) 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 di enzima e substrato ricostituite sono stabili per almeno 10 giorni a 2-8°C. Dopo la ricostituzione, le miscele di enzima e substrato possono essere congelate e conservate nelle fiale originali a una temperatura compresa tra -15 e -25°C. I reagenti congelati non devono essere sottoposti a più di 6 cicli di congelamento-scongelo.

Nota: i nucleotidi non devono essere congelati.

Se conservato alle condizioni specificate, il kit *therascreen* RAS Extension Pyro si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata.

Raccolta dei campioni, preparazione per l'analisi e conservazione

Nota: tutti i campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.

Il materiale campione deve essere DNA genomico umano estratto da tessuto FFPE. Il trasporto deve avvenire secondo la metodologia di patologia standard per garantire la qualità dei campioni.

I campioni tumorali sono eterogenei e i dati ottenuti da un campione tumorale potrebbero non concordare con i dati ottenuti da altre sezioni dello stesso tumore. I campioni tumorali possono inoltre contenere tessuto non tumorale. È possibile che il DNA appartenente al tessuto non tumorale non contenga le mutazioni rilevate dal kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Preparazione dei campioni tissutali

Nota: gli scalpellini devono essere asciutti. Non svolgere questa procedura sotto una cappa a flusso laminare o aspirante.

- Utilizzando uno scalpellino nuovo per ogni campione, raschiare il tessuto tumorale dalle sezioni e raccoglierlo in provette per microcentrifuga etichettate.

Preparazione di campioni di tessuto per l'estrazione del DNA

- Utilizzando materiali e metodi standard, fissare il campione di tessuto in formalina 10% neutra tamponata e includere il campione di tessuto in paraffina. Utilizzando un microtomo tagliare sezioni seriali di 5 µm dal blocco di paraffina e montarle su vetrini di vetro.

- Affidare a un professionista qualificato (ad esempio, un patologo) lo studio di una sezione colorata con ematossilina ed eosina (EE) per valutare il contenuto tumorale e determinare l'area. Contrassegnare il vetrino colorato per distinguere il tumore dal tessuto normale. Utilizzare sezioni seriali per l'estrazione del DNA.
- Utilizzare sezioni con un contenuto tumorale che rappresenti oltre il 20% dell'area, quindi sottoporle a trattamento senza macrodissezione (vedere punto successivo).
- Nel caso di sezioni con un contenuto tumorale che rappresenti meno del 20% dell'area, macrodissezionare una o più sezioni. Scartare il tessuto non tumorale.
- Nel caso di sezioni che hanno un'area inferiore a 4 mm², trattare due o più sezioni in modo da aumentare l'area tumorale totale fino a 4 mm² almeno (vale per entrambi i tipi di campioni, con e senza macrodissezione). Scartare il tessuto non tumorale.
- Raschiare via la paraffina in eccesso dal tessuto utilizzando uno scalpello nuovo sterile.

Conservazione

Conservare i blocchi FFPE e i vetrini a temperatura ambiente. I vetrini possono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 4 settimane prima dell'estrazione del DNA.

Il DNA genomico può essere conservato a 2-8°C per 1 settimana dopo l'estrazione e, successivamente, tra -15°C e -25°C per un massimo di 8 settimane prima dell'uso.

Procedura

Isolamento del DNA

Il kit QIAGEN illustrato più avanti (Tabella 3) è consigliato per la purificazione del DNA per il tipo di campione umano indicato, oltre che per l'uso con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro. Per utilizzare questo kit, seguire le istruzioni sulla purificazione del DNA fornite nel manuale corrispondente.

Tabella 3. Kit per la purificazione del DNA consigliati per l'uso con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Materiale campione	Kit per l'estrazione degli acidi nucleici	N° di catalogo
Tessuto incluso in paraffina	QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404

Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24

Prima di iniziare

- Creare una configurazione del dosaggio come descritto nella sezione "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro", pagina 65. Questa operazione deve essere eseguita una sola volta, prima di eseguire il dosaggio RAS Extension Pyro per la prima volta.
- Evitare di posizionare i campioni con un segnale ad alta intensità vicino ai pozzetti contenenti i controlli senza template o ai pozzetti dai quali si attendono segnali bassi. In caso contrario potrebbero formarsi segnali di crosstalk tra i pozzetti, per cui un segnale prodotto da un pozzetto potrebbe essere rilevato in un pozzetto vicino.

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 20).
3. Allestire la piastra per tutti gli 8 test del kit theascreen RAS Extension Pyro, aggiungendo i dosaggi nei pozzetti corrispondenti ai campioni da analizzare.

Nota: è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA templato) in ogni allestimento PCR con almeno un dosaggio.

Nota: includere un campione con il DNA di controllo non metilato come controllo wild-type per ciascun dosaggio in ogni processo di pirosequenziamento (vedere "Figura 2. Flusso di lavoro della procedura del kit theascreen RAS Extension Pyro.", pagina 8).

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). Quando compare il report, fare clic su .
5. Chiudere il file di processo e copiarlo su una penna USB (fornita con il sistema) utilizzando Windows® Explorer.

Nota: le informazioni di pre-elaborazione stampate possono essere utilizzate come modello per l'allestimento dei campioni (vedere "Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance", pagina 25).

Nota: per avviare l'elaborazione della piastra sul sistema PyroMark Q24, vedere "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24", pagina 32.

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 da utilizzare per il processo; fare riferimento alle istruzioni fornite con i prodotti.
- **“Plate ID” (ID della piastra, facoltativo):** immettere l’ID della piastra PyroMark Q24.
- **“Bar code” (Codice a barre, facoltativo):** 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.
- **“Kit and Reagent ID” (ID reagente e kit, facoltativo):** immettere il numero di lotto del kit *therascreen* RAS Extension Pyro da utilizzare. Il numero di lotto è indicato sull’etichetta del prodotto.

Nota: indicare sempre il numero di lotto, in modo da facilitare la ricostruzione di eventuali problemi imprevisi con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

- **“Run note” (Nota sul processo, facoltativo):** Enter a note about the contents or purpose of the run.

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 per PCR inclusi nel kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Questo protocollo descrive l'amplificazione mediante PCR di 8 regioni separate negli esoni 3 e 4 del gene KRAS umano e negli esoni 2, 3 e 4 del gene NRAS umano, eseguita con il kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Punti importanti prima di iniziare

- La DNA polimerasi HotStarTaq® contenuta nella soluzione Master Mix per 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 fisicamente separata dall'area in cui si eseguono la purificazione del DNA, l'aggiunta del template alla PCR, l'analisi del prodotto della PCR o la preparazione dei campioni prima dell'analisi Pyrosequencing.
- Utilizzare puntali monouso contenenti filtri idrofobici per ridurre al minimo la contaminazione crociata.

Prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i primer per PCR, centrifugare brevemente per fare depositare il contenuto sul fondo delle provette.
- Correggere la concentrazione del DNA del campione e del controllo, se necessario, fino a 0,4-2 ng/µl.

Procedura

1. Scongelare tutti i componenti necessari (vedere la Tabella 4, pagina 23).
Miscelare con cura prima dell'uso.

2. Preparare una miscela di reazione per ogni set di primer per PCR, in base alla Tabella 4.

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

Preparare la miscela di reazione per il numero totale di dosaggi PCR da eseguire, più un volume extra.

Tabella 4. Preparazione della miscela di reazione per ogni set di primer per PCR

Componente	Volume/reazione (µl)
PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5
CoralLoad Concentrate, 10x	2.5
PCR Primer KRAS 59/61 o PCR Primer KRAS 117 o PCR Primer KRAS 146 o PCR Primer NRAS 12/13 o PCR Primer NRAS 59 o PCR Primer NRAS 61 o PCR Primer NRAS 117 o PCR Primer NRAS 146	1
Acqua (H ₂ O, fornita)	4
Volume totale	20

3. Mescolare la miscela di reazione accuratamente, quindi dispensarne 20 µl 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 µl di DNA template (2-10 ng di DNA genomico) nelle singole provette per PCR (vedere Tabella 5), quindi miscelare con cura.

Nota: è necessario includere un campione di controllo negativo (senza DNA template) in ogni configurazione PCR con almeno un dosaggio.

Nota: includere un campione con il DNA di controllo non metilato come controllo wild-type per ciascun dosaggio in ogni processo di pirosequenziamento (vedere “Controlli”, pagina 8).

Tabella 5. Preparazione della PCR

Componente	Volume/reazione (µl)
Miscela di reazione	20
DNA campione	5
Volume totale	25

5. Programmare il termociclatore nel rispetto delle istruzioni del produttore, adottando le condizioni descritte nella Tabella 6.

Tabella 6. Protocollo di ciclaggio ottimizzato

	Durata	Temperatura	Commenti
Fase di attivazione iniziale:	15 min	95°C	La DNA polimerasi HotStarTaq viene attivata da questa fase di riscaldamento.
Ciclaggio a 3 fasi:			
Denaturazione	20 s	95°C	
Appaiamento	30 s	53°C	
Estensione	20 s	72°C	
Numero di cicli	42	–	
Estensione finale:	5 min	72°C	

6. Posizionare le provette PCR nel termociclatore e avviare il programma di ciclaggio.
7. Dopo l’amplificazione, procedere con il “Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sepharose High Performance”, pagina 25.
- I campioni per la PCR possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di 3 giorni.

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

Questo protocollo prevede l'immobilizzazione del DNA template su grani Streptavidin Sepharose High Performance prima dell'analisi con il sistema PyroMark Q24.

Prima di iniziare

- Prima di iniziare, attendere che tutti i reagenti e le soluzioni abbiano raggiunto la temperatura ambiente (15-25°C).
- Accendere il sistema PyroMark Q24 almeno 30 minuti prima di avviare il processo. L'interruttore di alimentazione si trova sul retro dello strumento.
- Posizionare un portapiastre PyroMark Q24 su un blocco preriscaldato a 80°C. Lasciare un secondo portapiastre PyroMark Q24 a temperatura ambiente (15-25°C).
- Il tampone di lavaggio PyroMark viene fornito in forma concentrata 10x. Prima di utilizzare il concentrato per la prima volta, diluirlo in modo da ottenere una soluzione di lavoro 1x: a questo scopo, aggiungere 225 ml di acqua altamente depurata per 25 ml di tampone di lavaggio PyroMark 10x (volume finale: 250 ml).

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

- Allestire la stazione del vuoto PyroMark Q24 per la preparazione dei campioni, secondo le indicazioni contenute nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

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 7.

Preparare un volume extra rispetto al volume necessario per il numero totale di reazioni (numero di reazioni + uno extra).

Tabella 7. Soluzione Master Mix per l'immobilizzazione del DNA

Componente	Volume/reazione (µl)
PyroMark Binding Buffer	40
Acqua (H ₂ O, fornita)	29
Streptavidin Sepharose High Performance	1
Volume totale	70

3. Aggiungere 70 µl della soluzione Master Mix nei 24 pozzetti della piastra per PCR, in base alla configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 19).

I grani Sepharose sedimentano velocemente. Assicurarsi che la soluzione Master Mix resti omogenea ripetendo spesso la miscelazione con una pipetta o con l'agitatore vortex ad impulsi. Non centrifugare la soluzione Master Mix.

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 "**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**", pagina 22).

Dopo l'aggiunta della soluzione Master Mix e del prodotto della PCR, il volume totale in ogni pozzetto deve essere di 80 µl.

5. Sigillare la piastra per PCR con la pellicola adesiva.

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.

Durante questo passaggio, procedere immediatamente con il "Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi Pyrosequencing sul sistema PyroMark Q24", pagina 27.

Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi Pyrosequencing sul sistema PyroMark Q24

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

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i primer di sequenziamento, centrifugare brevemente per fare depositare il contenuto sul fondo delle provette.
- Aggiungere i diversi primer di sequenziamento secondo lo stesso schema impostato per la piastra nella configurazione del processo (vedere "Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24", pagina 19), a seconda della regione da analizzare.
- Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro seguendo le istruzioni fornite nel manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* a scadenze regolari e sostituire le sonde del filtro quando indicato.

Procedura

1. Diluire una quantità sufficiente di ciascun primer di sequenziamento nel tampone di appaiamento PyroMark, come illustrato nella Tabella 8.

Preparare un volume extra del primer di sequenziamento diluito rispetto al volume necessario per il numero totale di campioni da sottoporre al sequenziamento (sufficiente per il numero di campioni + uno extra).

Non diluire e non conservare più primer di sequenziamento del necessario.

Tabella 8. Esempio di diluizione dei primer di sequenziamento

Componente	Volume/campione (µl)	Volume per 9 + 1 reazioni (µl)
PyroMark Annealing Buffer	24.2	242
Seq Primer KRAS 59/61 o Seq Primer KRAS 117 o Seq Primer KRAS 146 o Seq Primer NRAS 12/13 o Seq Primer NRAS 59 o Seq Primer NRAS 61 o Seq Primer NRAS 117 o Seq Primer NRAS 146	0.8	8
Volume totale	25	250

2. Aggiungere 25 µl 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 19).

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

3. Accendere la pompa del vuoto della stazione del vuoto PyroMark Q24.
4. Appoggiare la piastra per PCR (Protocollo 3) e la piastra PyroMark Q24 sulla stazione del vuoto (Figura 3).

Ispezionare la piastra PCR e assicurarsi che i grani Sepharose siano in soluzione. Assicurarsi che la piastra per PCR abbia lo stesso orientamento assunto durante il caricamento dei campioni.



Figura 3. Posizionamento della piastra per PCR e della piastra PyroMark Q24 sulla stazione del vuoto.

5. Applicare il vuoto allo strumento accendendo l'interruttore del vuoto.
6. Immergere lentamente le sonde del filtro dello strumento del vuoto nella piastra per PCR (o nelle strisce), in modo da catturare i grani contenenti il template immobilizzato. Tenere le sonde in posizione per 15 secondi. Prestare molta cura nel sollevare lo strumento del vuoto.

Nota: i grani Sepharose sedimentano velocemente e devono essere catturati subito dopo l'agitazione. Se è trascorso più di 1 minuto dall'agitazione della piastra, agitare di nuovo la piastra per 1 minuto prima di catturare i grani.

Ispezionare la piastra per PCR per assicurarsi che lo strumento del vuoto abbia aspirato tutti i campioni.

7. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di etanolo al 70% (**recipiente 1, Figura 3**). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.
8. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 40 ml di soluzione di denaturazione (**recipiente 2, Figura 3**). Sciacquare le sonde del filtro per 5 secondi.

9. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene 50 ml di tampone di lavaggio (**recipiente 3, Figura 3**). Sciacquare le sonde del filtro per 10 secondi.
10. Sollevare e reclinare lo strumento del vuoto di oltre 90° in verticale per 5 secondi, in modo che il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 4).



Figura 4. Illustrazione dello strumento del vuoto sollevato di oltre 90° in verticale.

11. Tenendo lo strumento del vuoto sopra la piastra PyroMark Q24, spegnere l'interruttore del vuoto.
12. Liberare i grani nella piastra PyroMark Q24 immergendo le sonde del filtro nel primer di sequenziamento diluito e muovendo con cautela lo strumento del vuoto da un lato all'altro.
Nota: fare attenzione a non danneggiare la superficie della piastra PyroMark Q24 graffiandola con le sonde del filtro.
13. Trasferire lo strumento del vuoto nel recipiente che contiene acqua altamente depurata (**recipiente 4, Figura 3**) e agitare lo strumento del vuoto per 10 secondi.
14. Lavare le sonde del filtro immergendole nell'acqua altamente depurata (**recipiente 5, Figura 3**) e applicare il vuoto. Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata.

15. Sollevare e reclinare lo strumento del vuoto di oltre 90° in verticale per 5 secondi, in modo che il liquido possa defluire dalle sonde del filtro (Figura 4).

16. Spegner l'interruttore del vuoto e collocare lo strumento del vuoto nella posizione di sosta (P).

17. Spegner la pompa del vuoto.

Nota: al termine della giornata di lavoro è necessario smaltire i rifiuti liquidi e le soluzioni residue, verificando che non vi siano polveri o perdite sulla stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24. Vedere "Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti", pagina 71.

18. Riscaldare la piastra PyroMark Q24 contenente i campioni a 80°C per 2 minuti utilizzando il portapiastre PyroMark Q24 preriscaldato.

19. 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.

Passare direttamente al "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24, pagina 32.

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'avvio e il completamento di un processo 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 19), contiene informazioni sui volumi di nucleotidi, tampone di enzima e tampone di substrato necessari per un processo specifico.
- Caricare i puntali monouso (senza filtri idrofobici) per garantire il corretto funzionamento della cartuccia.

Procedura

1. Sciogliere le miscele enzimatiche e di substrato liofilizzate in 620 µl di acqua (H₂O, inclusa nel kit).
2. Miscelare agitando delicatamente la fiala con un movimento rotatorio.

Nota: non agitare in vortex.

Per assicurare che la miscela 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.

5. Caricare la cartuccia PyroMark Q24 con i volumi appropriati di nucleotidi, miscela enzimatica e miscela di substrato (Figura 5, pagina 33).

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

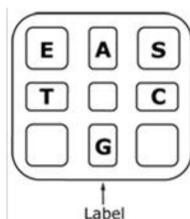


Figura 5. Illustrazione della cartuccia PyroMark Q24 vista dall'alto.. Le annotazioni corrispondono all'etichetta sulle fiale dei reagenti. Aggiungere la miscela enzimatica (E), la miscela di substrato (S) e i nucleotidi (A, T, C, G) rispettando i volumi indicati nel report "Pre Run-Information" (Informazioni 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 sia visibile sul lato anteriore della cartuccia, 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 portapietra e rimuovere la piastra dal blocco riscaldante.
 20. Chiudere il telaio portapietra 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 al "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 35.

Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24

Questo protocollo descrive l'analisi della mutazione con il software PyroMark Q24, relativamente ad un processo *therascreen* RAS Extension Pyro finito.

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 AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.
4. Utilizzando il RAS Extension Plug-In Report per generare un report plug-in, selezionare "AQ Add On Reports/RAS Extension" (Report aggiuntivi AQ/RAS Extension) dal menu "Reports" (Report) (vedere Figura 6).

Nota: le mutazioni nel codone 61 del gene KRAS devono essere analizzate anche con un plug-in KRAS a parte, selezionando "AQ Add On Reports/KRAS/Codon 61" (Report aggiuntivi AQ/KRAS/codone 61) dal menu "Reports" (Report).

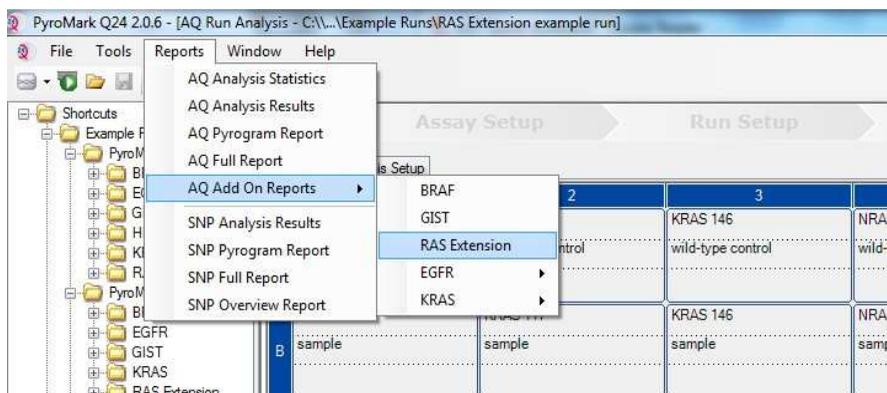


Figura 6. Menu RAS Extension Plug-In Report.

I pozzetti verranno analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni di cui è indicato il valore LOD nella Tabella 9, pagina 43. I risultati verranno presentati in una tabella riassuntiva (Figura 7), seguiti da risultati dettagliati contenenti pirogrammi e qualità dell'analisi.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	KRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A2	KRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A3	KRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
A4	NRAS Codon 12 and 13	wild-type control	No mutation detected				
A5	NRAS Codon 59	wild-type control	No mutation detected				
A6	NRAS Codon 61	wild-type control	No mutation detected				
A7	NRAS Codon 117	wild-type control	No mutation detected				
A8	NRAS Codon 146	wild-type control	No mutation detected				
B1	KRAS Codon 59	sample	Mutation	35,0	175G>A	A59T	
B2	KRAS Codon 117	sample	No mutation detected				
B3	KRAS Codon 146	sample	Mutation	29,6	437C>T	A146V	
B4	NRAS Codon 12 and 13	sample	No mutation detected				
B5	NRAS Codon 59	sample	Mutation	20,5	176C>G	A59G	
B6	NRAS Codon 61	sample	No mutation detected				
B7	NRAS Codon 117	sample	Potential low level mutation	5,0	351G>C	K117N	⚠
B8	NRAS Codon 146	sample	No mutation detected				
C1	KRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C2	KRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C3	KRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠
C4	NRAS Codon 12 and 13	NTC	Failed Analysis				⚠
C5	NRAS Codon 59	NTC	Failed Analysis				⚠
C6	NRAS Codon 61	NTC	Failed Analysis				⚠
C7	NRAS Codon 117	NTC	Failed Analysis				⚠
C8	NRAS Codon 146	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Figura 7. RAS Extension Plug-In Report

5. Uso dell'analisi AQ:

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 alleliche) e la valutazione della qualità compaiono sopra alla posizione della variabile nel pirogramma. Per maggiori dettagli su come analizzare un processo, fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Per generare un report, nel menu “Reports” selezionare “AQ Full Report” (Report completo AQ) oppure “AQ Analysis Results” (Risultati analisi AQ).

Nota: per ottenere risultati attendibili, è consigliabile utilizzare altezze del picco singolo superiori a 30 RLU. Impostare 30 RLU come “required peak height for passed quality” (altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato) nella configurazione dei dosaggi e assicurarsi che il fattore di riduzione del picco A sia impostato su 0,86 per l’analisi del codone 61 del gene NRAS (vedere “Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro”, pagina 65, e il manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*).

Per documentare e interpretare la quantificazione allelica è opportuno utilizzare il report “AQ Analysis Results” (Risultati analisi AQ). 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 Pyrogram (Pirogramma). I picchi misurati devono corrispondere all’altezza delle barre dell’istogramma. Vedere anche pagina 40 “Interpretazione dei risultati”.

Ripetizione dell’analisi per i campioni senza mutazioni rilevate con “Sequence to analyze” (Sequenza da analizzare) standard o con valutazione della qualità “Check” (Controllare) o “Failed” (Controllo non superato)

La sequenza da analizzare standard, così com’è definita nella configurazione dell’analisi, riguarda le mutazioni puntiformi più frequenti nei saggi *therascreen* RAS Extension Pyro.

Si raccomanda vivamente di rianalizzare manualmente tutti i campioni nei quali non sia stata rilevata nessuna mutazione con la sequenza da analizzare standard, ma anche tutti i campioni che abbiano ottenuto una valutazione della qualità “Check” (Controllare) o “Failed” (Controllo non superato). Le valutazioni della qualità “Check” e “Failed” potrebbero indicare una mutazione che non viene rilevata dalla sequenza da analizzare standard e che potrebbe generare picchi di riferimento inattesi.

Per ripetere l’analisi selezionando come target altre mutazioni, scegliere “Analysis Setup” (Configurazione analisi) e, nel campo “Sequence to Analyze” (Sequenza da

analizzare), impostare le varianti descritte nella Tabella 16 e Tabella 17 nell'Appendice A oppure le varianti per altre mutazioni rare o inattese. Fare clic su "Apply" (Applica) e quindi su "To All" (A tutto) quando viene visualizzata la finestra "Apply Analysis Setup" (Applica configurazione analisi).

Le frequenze aggiornate delle mutazioni nei geni KRAS e NRAS umani sono disponibili online, sul sito del Sanger Institute, all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Nota: dopo avere modificato la sequenza da analizzare, assicurarsi che la soglia per l'altezza del picco singolo sia impostata su 30 RLU e che il fattore di riduzione del picco A sia impostato su 0,86 per l'analisi del codone 61 NRAS (vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro").

Nota: nella regione sequenziata potrebbero essere presenti ulteriori mutazioni rare o inattese, che possono essere analizzate con la sequenza da analizzare ("Sequence to Analyze") alternativa, in cui sono contemplate anche le mutazioni inattese.

Nota: nel caso in cui i picchi misurati non corrispondano all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non possa essere spiegato con mutazioni rare o inattese, non sarà possibile utilizzare il risultato come base per la valutazione dello stato mutazionale. È consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Interpretazione dei risultati

Interpretazione dei risultati dell'analisi e rilevazione delle mutazioni di basso livello

Includere un campione di DNA di controllo per ogni dosaggio in ogni processo di pirosequenziamento. Ciò è necessario se si desidera giungere ad un'interpretazione adeguata dei risultati e all'identificazione delle mutazioni di basso livello, oltre che per eseguire un controllo dei livelli di fondo. La frequenza misurata del campione di controllo deve essere minore o uguale al limite del bianco (limit of blank, LOB). Per determinare la presenza di una mutazione, è possibile utilizzare i valori del limite del bianco (limit of blank, LOB) e del limite di rilevazione (limit of detection, LOD). Questi valori sono stati ottenuti usando miscele di plasmidi contenenti la sequenza wild-type o la sequenza mutata corrispondente.

Dopo l'analisi con il software PyroMark Q24 o i Plug-In Report, sono possibili 3 risultati. Per i dati LOD, vedere la Tabella 9.

- Frequenza mutazione < LOD: mutazione non rilevata
- Frequenza mutazione > LOD + 3 unità %: mutazione
- Frequenza mutazione \geq LOD e \leq LOD + 3 unità %: potenziale mutazione di basso livello

Nota: se si utilizza il RAS Extension Plug-In Report (vedere il passaggio 5 del "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 35) e si verifica questa evenienza, viene generata un'avvertenza.

L'intervallo tra LOD e LOD + 3 unità % consente la rilevazione delle mutazioni di basso livello in condizioni ottimali. Se nel campione di controllo non metilato viene rilevata una frequenza superiore al valore LOB, potrebbe significare che nel processo corrispondente è presente un livello di fondo più alto del normale. Ciò potrebbe influenzare la

quantificazione allelica, in particolare per i livelli mutazionali bassi. Pertanto i risultati con avvertenza “Potential low level mutation” (Potenziale mutazione di basso livello) devono essere attentamente valutati.

I campioni che generano un risultato di potenziale mutazione di basso livello devono essere considerati positivi alla mutazione se il risultato viene confermato ripetendo il processo in duplicato con il DNA di controllo non metilato. Il risultato di entrambe le misurazioni in duplicato deve indicare la stessa mutazione con valori \geq LOD e il campione di controllo deve risultare “No mutation detected” (Nessuna mutazione rilevata). In caso contrario, il campione deve essere classificato come “No mutation detected” (Nessuna mutazione rilevata).

Un aumento del fondo per una mutazione può essere rilevato confrontando i valori del limite del bianco (LOB) riportati nel manuale e le misurazioni ottenute con il DNA di controllo non metilato. I campioni che generano il risultato di potenziale mutazione di basso livello possono essere classificati come “Mutation not detected” (Mutazione non rilevata) senza necessità di ripetizione se la frequenza misurata per il DNA di controllo non metilato è maggiore del valore LOB indicato nel manuale della mutazione specifica. Si possono pertanto presentare 3 situazioni diverse nel caso di mutazioni di basso livello.

1. Frequenza di misurazione con DNA di controllo non metilato $>$ LOB per la mutazione specifica: il campione può essere classificato come “Mutation not detected” (Mutazione non rilevata) senza necessità di ripetizione.
2. Risultato non riprodotto in duplicato con lo stesso risultato: classificare il campione come “Mutation not detected” (Mutazione non rilevata).
3. Stessi risultati riprodotti in duplicato e DNA di controllo non metilato $<$ LOB per la mutazione specifica: “Mutation detected” (Mutazione rilevata).

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

dell'istogramma. I grafici Pyrogram devono essere esaminati per valutare la presenza di eventuali picchi imprevisti. Se i picchi misurati non corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non può essere spiegato con mutazioni rare o inattese, è consigliabile analizzare nuovamente il campione. Il risultato errato non può essere utilizzato come base per una valutazione dello stato mutazionale. Quando una mutazione è valida, una variazione di altezza di un picco è sempre correlata ad una corrispondente variazione di altezza di un altro picco. Una variazione di altezza di un solo picco non deve essere ritenuta indicativa di una mutazione.

Nota: per l'interpretazione dei risultati è consigliabile utilizzare l'RAS Extension Plug-in Report. Per un esame più accurato dei campioni i cui risultati segnalano una potenziale mutazione di basso livello, è consigliabile eseguire un'ulteriore analisi manuale del campione nel software dell'applicazione (ad esempio, un confronto con la frequenza mutazionale del campione di controllo).

Nota: qualsiasi decisione terapeutica riguardante i pazienti oncologici non deve basarsi esclusivamente sullo stato mutazionale dei geni KRAS e NRAS.

Tabella 9. Valori LOB e LOD determinati per mutazioni specifiche

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
KRAS codone 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codone 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codone 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codone 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codone 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codone 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
NRAS codone 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codone 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codone 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codone 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso Sanger Institute, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Livello di mutazione più basso che, in un campione, genera una frequenza misurata \geq LOD.

Risultati rappresentativi

Dalla Figura 8 alla Figura 15 sono illustrati risultati rappresentativi dei tracciati Pyrogram.

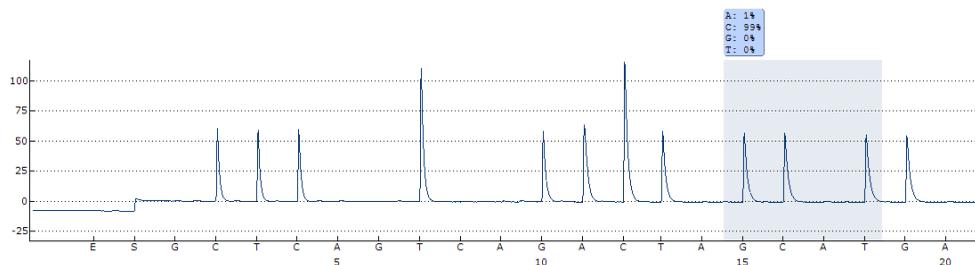


Figura 8. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio KRAS 59/61.

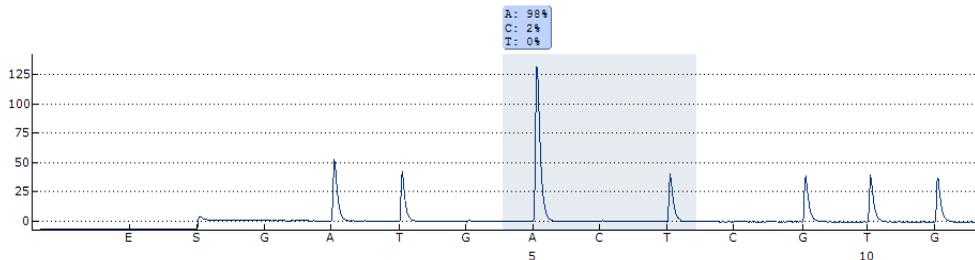


Figura 9. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio KRAS 117.

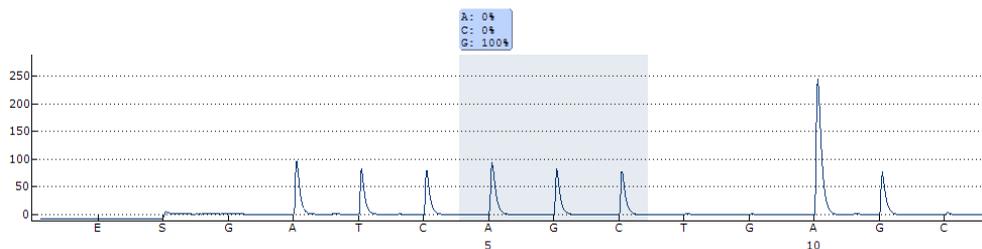


Figura 10. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio KRAS 146.

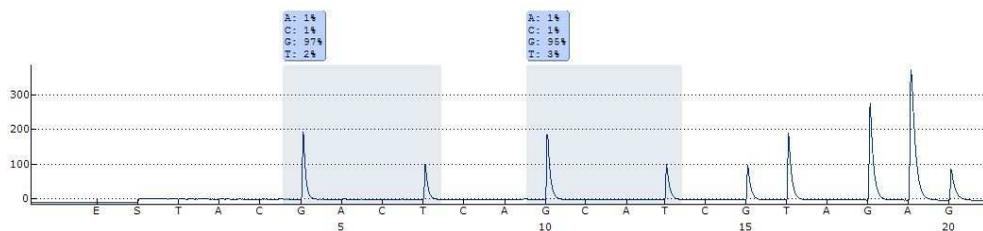


Figura 11. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio NRAS 12/13.

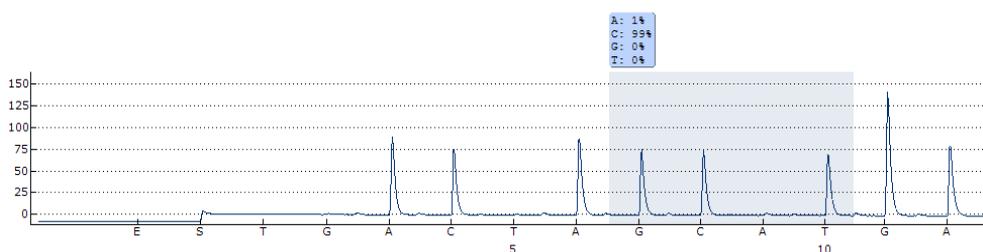


Figura 12. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio NRAS 59.

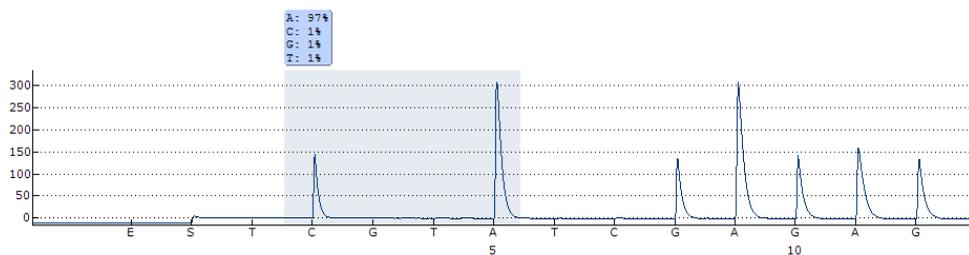


Figura 13. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio NRAS 61.

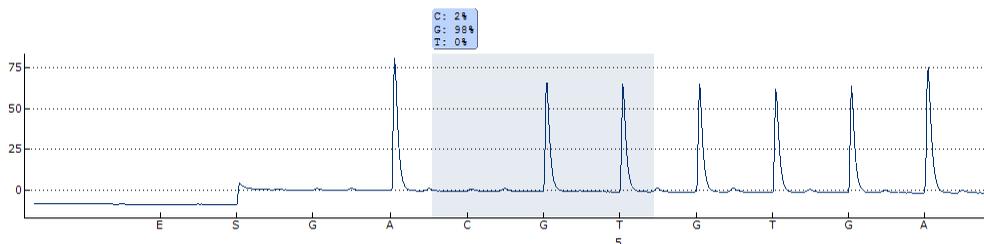


Figura 14. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio NRAS 117.

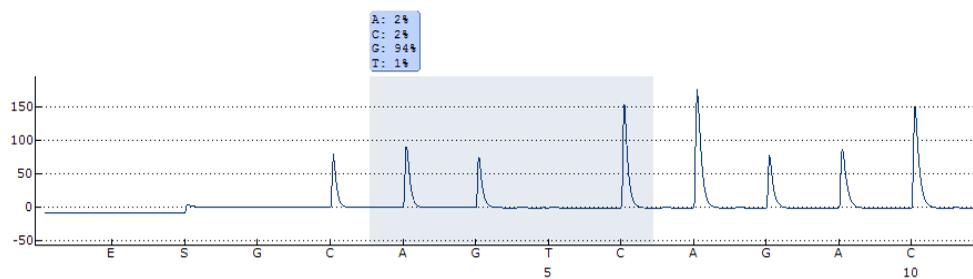


Figura 15. Pirogramma ottenuto dopo l'analisi di un campione con genotipo wild-type nel dosaggio NRAS 146.

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. 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).

Commenti e suggerimenti

Risultato "Check" (Controllare) o "Failed" (Controllo non superato)

- | | |
|--|--|
| a) Altezza del picco bassa | <p>Errori di gestione relativi alla configurazione PCR o alla preparazione del campione prima della procedura di pirosequenziamento possono causare picchi bassi.</p> <p>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) usata per l'immobilizzazione consenta l'aspirazione completa dei campioni.</p> <p>Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro seguendo le istruzioni fornite nel manuale utente <i>PyroMark Q24 User Manual</i> a scadenze regolari e sostituire le sonde del filtro quando indicato.</p> <p>In presenza di un avviso "Check" (Controllare), confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma; per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra Pyrogram (Pirogramma). Se i picchi misurati corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma, il risultato è valido. In caso contrario si raccomanda di ripetere l'analisi del campione.</p> |
| b) Mutazione non definita nella sequenza da analizzare | <p>Correggere la sequenza da analizzare nella configurazione del dosaggio (vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi <i>therascreen RAS Extension Pyro</i>", pagina 65), quindi ripetere il processo. Le mutazioni che non sono coperte dalle sequenze da analizzare possono essere identificate con il simulatore di pattern.</p> |

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|---|
| c) Mutazione rara inattesa | Un pattern inatteso di picchi può causare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Controllo non superato). Ciò può indicare la presenza di una mutazione inattesa, che non viene analizzata dalla sequenza specificata. I campioni interessati da questo fenomeno devono essere analizzati utilizzando la sequenza da analizzare alternativa, che tiene conto delle mutazioni inattese. Le mutazioni che non sono coperte dalle sequenze da analizzare possono essere identificate con il simulatore di pattern. |
| d) Avviso relativo alla deviazione elevata nell'altezza del picco per una dispensazione | È necessario confrontare attentamente il pirogramma con l'istogramma; per visualizzare quest'ultimo, fare clic con il pulsante destro del mouse nella finestra Pyrogram (Pirogramma). Se i picchi misurati non corrispondono all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non può essere spiegato con la presenza di mutazioni rare, si raccomanda di analizzare nuovamente il campione. |

Fondo elevato

- | | |
|--|--|
| a) Conservazione impropria dei nucleotidi | Conservare i nucleotidi a 2-8°C. La conservazione tra -15 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. |

Segnale assente nel controllo positivo (DNA di controllo non metilato)

- | | |
|---|---|
| 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 in base alle istruzioni contenute nelle sezioni "Conservazione e gestione dei reagenti" a pagina 16 e "Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24" a pagina 32. |
| c) Errore relativo alla PCR o alla preparazione del campione | Pulire accuratamente la cartuccia rispettando le istruzioni fornite nel foglio illustrativo del prodotto. Conservare la cartuccia al riparo da luce e polvere. |

Controllo di qualità

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

Limitazioni

Il test è progettato per la rilevazione di 37 mutazioni nei geni KRAS o NRAS. I campioni con risultati "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata) potrebbero celare mutazioni dei geni KRAS o NRAS che non vengono rilevate dal saggio.

La rilevazione delle mutazioni dipende dall'integrità del campione e dalla quantità di DNA amplificabile presente nel campione.

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è utilizzato in una procedura basata sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Come accade con tutte le procedure PCR, i campioni potrebbero essere contaminati da fonti esterne di DNA presenti nel laboratorio o dal DNA contenuto nel controllo positivo. Prestare attenzione per evitare la contaminazione dei campioni e dei reagenti delle miscele delle reazioni.

Tutti i risultati diagnostici che verranno generati dovranno essere interpretati contestualmente 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 stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Caratteristiche prestazionali

Limite del bianco e limite di sensibilità

Si è proceduto alla determinazione del limite del bianco (limit of blank, LOB) e del limite di sensibilità (limit of detection, LOD) per un certo numero di mutazioni utilizzando miscele di plasmidi (Tabella 10). I valori LOB e LOD sono stati calcolati sulla base delle raccomandazioni contenute nei documenti *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guideline EP17-A "Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline"* (NRAS codoni 12, 13, 61 e KRAS codone 61) e *EP17-A2 "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition"* (tutti gli altri codoni). Gli errori α e β (rispettivamente falso positivo e falso negativo) sono stati impostati sul 5%. I valori LOB rappresentano la frequenza misurata ottenuta con un campione wild-type. I valori LOD rappresentano il segnale più basso (frequenza misurata) che è possibile considerare positivo per la mutazione corrispondente.

Tabella 10. Valori LOB e LOD determinati per mutazioni specifiche

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
KRAS codone 59 (GCA)				
175G>A	A59T	0.5	3.5	546
176C>G	A59G	0.5	3.5	28518
KRAS codone 61 (CAA)				
183A>C	Q61H	0.8	2.8	554
182A>T	Q61L	1.2	3.1	553
182A>G	Q61R	1.6	3.5	552
183A>T	Q61H	0.7	2.6	555
181C>G	Q61E	1.2	3.1	550
KRAS codone 117 (AAA)				
351A>C	K117N	1.0	4.0	19940
351A>T	K117N	3.6	7.1	28519
KRAS codone 146 (GCA)				
436G>A	A146T	2.7	6.6	19404
436G>C	A146P	1.8	4.8	19905
437C>T	A146V	2.1	5.1	19900
NRAS codone 12 (GGT)				
34G>A	G12S	1.4	3.4	563
34G>T	G12C	0.6	2.5	562
34G>C	G12R	0.4	2.4	561
35G>A	G12D	1.8	3.8	564
35G>T	G12V	3.8	8.8	566
35G>C	G12A	0.5	2.5	565
NRAS codone 13 (GGT)				
37G>A	G13S	1.2	3.2	571
37G>T	G13C	1.2	3.2 (4) [†]	570
37G>C	G13R	0.3	2.3	569
38G>A	G13D	0.8	2.8	573
38G>T	G13V	0.0	2 (5) [†]	574
38G>C	G13A	0.8	2.8	575

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
NRAS codone 59 (GCT)				
175G>A	A59T	3.8	6.9	578
176C>G	A59G	0.0	3.0	–
NRAS codone 61 (CAA)				
181C>A	Q61K	4.1	6.7	580
182A>G	Q61R	0.8	2.2	584
182A>T	Q61L	0.7	2.1	583
183A>T	Q61H	0.4	1.8	585
183A>C	Q61H	5.4	8.0	586
183A>G	Q61Q	2.1	5.8	587
NRAS codone 117 (AAG)				
351G>C	K117N	1.4	4.4	–
351G>T	K117N	3.0	6.0	–
NRAS codone 146 (GCC)				
436G>A	A146T	1.4	4.4	27174
436G>C	A146P	3.5	7.2	–
437C>T	A146V	4.8	7.8	–

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso Sanger Institute, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

† Livello di mutazione più basso che, in un campione, genera una frequenza misurata \geq LOD.

Mutazioni GGT > TGT e GGT > GTT nel codone 13 NRAS

Per queste mutazioni, le misurazioni del bianco sono state in prevalenza di 0 unità %, pertanto hanno prodotto una distribuzione non Gaussiana. Il valore LOD è stato dunque determinato utilizzando un metodo diverso, sulla base delle indicazioni contenute nel documento CLSI Guideline EP17-A. Il segnale più basso che indica la presenza di una mutazione (LOD) in questa posizione è stato impostato su 2 unità % al di sopra del livello della corrispondente linea di base definita dal 95esimo percentile delle misurazioni del

bianco. Analizzando un campione con il livello di mutazione espresso tra parentesi nella Tabella 9, il 95% dei risultati (n = 72) ha prodotto un segnale che può essere considerato positivo (\geq LOD). Per i dati LOB/LOD, vedere la Tabella 10.

Nota: i primer per PCR e pirosequenziamento per i codoni 12, 13 e 61 del gene NRAS sono stati presi dal kit *therascreen* NRAS Pyro (n° cat. 971530) senza modificazioni. I dati sulle prestazioni per questo codone NRAS restano immutati.

Linearità

La linearità è stata calcolata utilizzando miscele di plasmidi contenenti la sequenza wild-type o la sequenza mutante delle mutazioni 176C>G nel codone 59 KRAS, 351A>T nel codone 117 KRAS, 436G>C nel codone 146 KRAS, 34G>A nel codone 12 NRAS, 37G>A nel codone 13 NRAS, 175G>A nel codone 59 NRAS, 182A>G nel codone 61 NRAS, 351G>C nel codone 117 NRAS e 437C>T nel codone 146 NRAS. I plasmidi sono stati miscelati in modo proporzionale per generare 4 livelli di mutazioni (5, 10, 30 e 50%). Ogni miscela è stata analizzata con 3 diversi lotti del kit *therascreen* RAS Extension Pyro in 3 processi di pirosequenziamento ripetuti 3 volte ciascuno.

I risultati (n = 9 per ogni livello di mutazione) sono stati analizzati in base alle indicazioni del documento CLSI Guideline EP6-A2 "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" utilizzando il software Analyse-it® versione 2.21. I risultati sono illustrati nella Figura 16.

Sono stati ottenuti risultati lineari nell'ambito di una non linearità ammissibile di 5 unità % entro l'intervallo 5-50% analizzato, relativo ai livelli di mutazione. Sono stati ottenuti risultati simili per tutte le mutazioni coperte nei codoni 59, 117, 146 del gene KRAS e nei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 del gene NRAS.

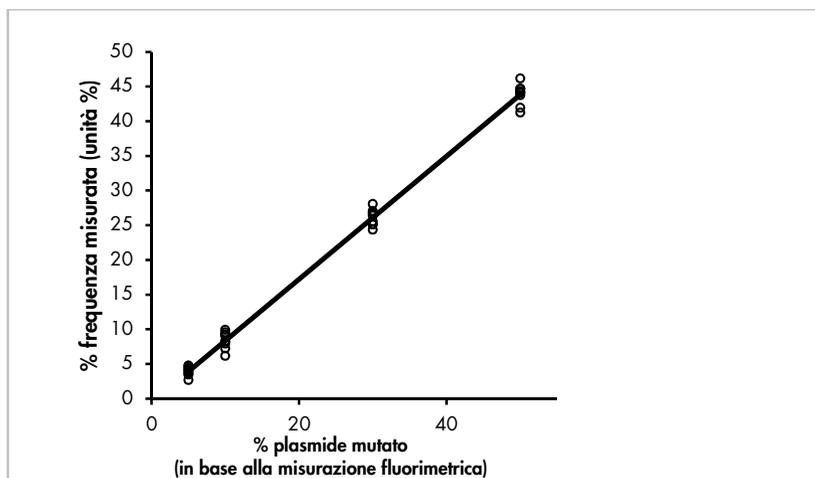


Figura 16. Linearità della mutazione 176C>G nel codone 59 del gene KRAS.

Sono stati ottenuti risultati simili per tutte le mutazioni coperte nei codoni 59, 117, 146 del gene KRAS e nei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 del gene NRAS.

Precisione

I dati relativi alla precisione consentono di determinare la variabilità totale dei dosaggi e sono stati ottenuti a 3 diversi livelli analizzando le miscele di plasmidi descritte in precedenza per 3 volte ciascuna.

La ripetibilità (variabilità nello stesso dosaggio e tra batch) è stata calcolata partendo dai dati per la determinazione della linearità (3 processi nella stessa giornata di lavoro con lotti differenti del kit *therascreen* RAS Extension Pyro). La precisione intermedia (variabilità nello stesso laboratorio) è stata calcolata sulla base di 3 processi che si sono svolti in uno stesso laboratorio in 3 giornate diverse. I processi sono stati eseguiti da operatori diversi, che hanno utilizzato gli strumenti PyroMark Q24 con altrettanti kit *therascreen* RAS Extension Pyro. La riproducibilità (variabilità tra laboratori) è stata calcolata sulla base di 2 processi

che si sono svolti in ciascuno dei due laboratori indipendenti coinvolti nello studio, utilizzando lotti differenti del kit *therascreen* RAS Extension Pyro.

Le stime relative alla precisione sono espresse come deviazione standard dalle frequenze di mutazione misurate in unità % (Tabella 11).

Tabella 11. Precisione delle mutazioni*

% plasmide mutato [†]	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
176C>G nel codone 59 KRAS						
5	4.0	0.7	3.8	0.6	4.2	1.1
10	8.4	1.2	8.5	1.0	8.4	1.4
30	26.1	1.2	26.3	1.1	26.8	1.2
50	43.9	1.5	44.0	0.7	43.7	1.3
351A>T nel codone 117 KRAS						
5	5.5	1.6	5.5	2.2	7.1	2.0
10	11.0	1.7	10.8	1.4	12.5	2.9
30	30.6	1.7	30.6	2.0	31.9	2.7
50	52.8	2.0	53.5	1.3	54.5	1.6
436G>C nel codone 146 KRAS						
5	4.2	0.6	4.1	0.5	3.7	1.2
10	9.6	0.9	9.1	0.9	8.6	1.3
30	29.0	0.9	28.8	1.0	28.1	1.1
50	47.5	1.5	46.8	0.7	45.6	1.9
34G>A nel codone 12 NRAS[‡]						
5	7.5	1.2	7.3	1.0	6.7	1.3
10	14.6	1.3	13.5	1.1	13.7	1.3
30	37.8	1.9	37.9	1.5	36.1	2.9
50	59.8	1.7	60.4	2.0	57.5	3.1
175G>A nel codone 59 NRAS						
5	7.8	0.9	7.3	0.5	7.1	1.3

% plasmide mutato [†]	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
10	11.9	1.0	11.6	2.0	12.5	1.7
30	29.5	1.1	29.6	1.2	29.9	1.9
50	49.0	1.1	48.3	1.3	48.9	1.4
182A>G nel codone 61 NRAS						
5	6.4	0.9	6.8	0.7	7.2	1.0
10	11.7	0.9	11.8	1.1	11.8	1.0
30	34.1	1.3	34.6	1.7	33.8	2.5
50	53.1	1.5	53.3	1.8	53.1	2.0
351G>C nel codone 117 NRAS						
5	4.9	0.2	5.0	0.3	4.5	0.8
10	9.4	0.4	10.3	1.5	9.4	0.5
30	28.7	0.9	28.8	0.7	28.3	1.3
50	48.5	0.4	48.8	0.6	48.8	0.6
437C>T nel codone 146 NRAS						
5	4.4	0.7	4.6	0.5	4.1	0.9
10	8.8	0.9	8.7	0.8	9.1	0.8
30	28.4	1.1	27.9	0.6	28.4	0.8
50	47.9	1.1	48.1	1.4	48.0	1.1

* Tutti i valori sono espressi in unità %. DS: deviazione standard (n=9 per ripetibilità e precisione intermedia, n=12 per riproducibilità).

† In base alla misurazione fluorimetrica, per 34G>A nel codone 12 NRAS basato su OD₂₆₀.

Valutazione diagnostica

Il kit *therascreen* RAS Extension Pyro è stato valutato in confronto con il sequenziamento di Sanger in 2 diversi studi.

Un primo studio era già stato eseguito in precedenza per valutare il kit *therascreen* NRAS Pyro in confronto con il sequenziamento di Sanger. Il DNA è stato estratto da 100 campioni tumorali FFPE di midollo osseo ed è stato analizzato per rilevare eventuali mutazioni nei codoni 12 e 13 e nel codone 61.

Dal momento che i dosaggi per i codoni 12/13 e 61 del gene NRAS nel kit *therascreen* NRAS sono stati inclusi nel kit *therascreen* RAS Extension Pyro senza modificazioni, vengono illustrati i risultati ottenuti dalla valutazione del kit *therascreen* NRAS Pyro.

Nel secondo studio, il DNA estratto da 110 campioni tumorali FFPE di mCRC è stato analizzato per rilevare eventuali mutazioni nei codoni 59, 61, 117 e 146 del gene KRAS umano e nei codoni 59, 117 e 146 del gene NRAS umano. Le mutazioni con bassa frequenza sono state analizzate utilizzando DNA plasmide arricchito con DNA FFPE wild-type.

In entrambi gli studi, il DNA è stato estratto con QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e successivamente analizzato con i dosaggi del kit *therascreen* RAS Extension Pyro sullo strumento PyroMark Q24. Il sequenziamento di Sanger è stato eseguito su uno strumento Applied Biosystems® 3730xl Genetic Analyzer.

Valutazione dei codoni 12, 13 e 61 del gene NRAS

Su 100 campioni analizzati con il sequenziamento di Sanger, è stato possibile determinare lo stato mutazionale di 97 campioni sia per il codone 12/13 che per il codone 61. In 4 dei 100 campioni, il sequenziamento di Sanger ha rilevato una mutazione nel codone 12 o nel codone 13.

In 2 dei 100 campioni, lo stato mutazionale è stato riprodotto utilizzando il kit *therascreen* NRAS Pyro e non è stata segnalata nessuna mutazione. I risultati sono illustrati nella Tabella 12. Non sono state rilevate mutazioni nel codone 61.

Escludendo i campioni che hanno generato errori con uno o con entrambi i metodi, la concordanza tra il kit *therascreen* NRAS Pyro e il sequenziamento di Sanger è stata del 98% per i codoni 12/13 e del 100% per il codone 61 rispettivamente. Vedere la Tabella 12.

Tabella 12. Risultati dei campioni analizzati per NRAS 12, 13 e 61

		Sequenziamento di Sanger				Totale
		Mutant in codon 12/13	Mutant in codon 61	Wild-type	Sconosciuto	
<i>therascreen</i> NRAS Pyro Kit	Mutant in codon 12/13	2	–	–	–	2
	Mutant in codon 61	–	–	–	–	–
	Wild-type	2	–	90	3	95
	Sconosciuto	–	–	3	–	3
	Totale	4	–	93	3	100

Valutazione dei codoni 59, 61, 117, 146 del gene KRAS e dei codoni 59, 117, 146 del gene NRAS

Il DNA estratto da 110 campioni tumorali FFPE di mCRC è stato analizzato per rilevare la presenza di mutazioni nei codoni 59, 61, 117 e 146 del gene KRAS umano e nei codoni 59, 117 e 146 del gene NRAS umano. A causa della scarsità di campioni clinici prevista, tutte le mutazioni coperte dal kit *therascreen* RAS Extension sono state analizzate in 56 campioni aggiuntivi utilizzando DNA plasmide arricchito con DNA FFPE wild-type. Tutte le mutazioni sono state rilevate da entrambi i metodi: pirosequenziamento e sequenziamento di Sanger.

Su 166 campioni analizzati, 137 campioni (83%) hanno generato risultati complessivamente concordanti tra il kit *therascreen* RAS Extension Pyro e il sequenziamento di Sanger.

I casi discordanti possono essere spiegati da vari fattori.

A causa di un fondo elevato, 20 campioni non hanno prodotto risultati con il sequenziamento di Sanger per NRAS 59.

Il sequenziamento di Sanger non ha rilevato le mutazioni in KRAS 59 in 1 campione e in KRAS 61 in 3 campioni. Tutte e 4 le mutazioni avevano prodotto risultati di bassa frequenza con il pirosequenziamento (7,5-13,1%). Ciò può essere spiegato con la minore sensibilità del sequenziamento di Sanger (15-20%) rispetto al pirosequenziamento (5%) (2). Tutti gli altri campioni validi erano di tipo wild-type per entrambi i metodi.

Un campione è stato classificato come sconosciuto in base al pirosequenziamento perché è stata rilevata una doppia mutazione (KRAS 59-61).

Quattro campioni contenenti DNA plasmide aggiunto presentavano un'ulteriore mutazione A>G nella posizione 350 della sequenza di codifica KRAS, che non è coperta dal kit *therascreen* RAS Extension Pyro. Le mutazioni sono state rilevate mediante analisi manuale.

Tabella 13. Risultati dei campioni analizzati per KRAS 59, 61, 117, 146 e per NRAS 59, 117, 146

		KRAS 59	KRAS 61	KRAS 117	KRAS 146	KRAS ^a	NRAS ^b	wt	Sconosciuti	Totale
iferascreen RAS Extension Pyro Kit	KRAS 59	8	–	–	–	–	–	–	1	9
	KRAS 61	–	6	–	–	–	–	2	1	9
	KRAS 117	–	–	4	–	–	–	–	–	4
	KRAS 146	–	–	–	3	4	–	–	–	7
	KRAS ^a	–	–	–	–	16	–	–	–	16
	NRAS ^b	–	–	–	–	–	28	–	–	28
	wt	–	–	–	–	–	–	71	16	87
	Sconosciuto	1	–	–	–	–	–	3	2	6
	Totale	9	6	4	3	20	28	76	20	166

WT: wild-type

^a Campioni arricchiti con KRAS contenenti entrambe le mutazioni KRAS 117 e 146.

^b Campioni arricchiti con NRAS contenenti le mutazioni NRAS 59, 117 e 146.

* Un campione con risultato mutante per KRAS 146 ma non valido per NRAS 117.

La sensibilità e la specificità dei dosaggi per ciascun codone è riportata nella Tabella 14.

Tabella 14. Sensibilità e specificità per i codoni 59, 61, 117, 146 KRAS e i codoni 59, 117, 146 NRAS

	Sensibilità	Specificità	Mutazione coperta
Mutation KRAS 59	100%	99%	175G>A / 176C>G
Mutation KRAS 61	100%	97%	181C>G / 182A>T / 183A>C / 183A>T
Mutation KRAS 117	100%	100%	351A>C / 351A>T
Mutation KRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T
Mutation NRAS 59	100%	100%	175G>A / 176C>G
Mutation NRAS 117	100%	100%	351G>C / 351G>T
Mutation NRAS 146	100%	100%	436G>A / 436G>C / 437C>T

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 tessuto FFPE. I dati del pirosequenziamento sono stati analizzati utilizzando il RAS Extension Plug-in Report per i codoni 59, 117, 146 KRAS e i codoni 59, 117 e 146 NRAS.

Riferimenti bibliografici

1. Douillard, J.Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., et al. (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023.
2. Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., et al. (2010) Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of *KRAS* mutations: diagnostic and clinical implications. *J. Mol. Diagn.* **12**, 425.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto sufficiente per <N> reazioni
	Utilizzare entro
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	
	Numero di catalogo
	Codice del lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Contenuto
	Numero
	Global Trade Item Number
	Limiti di temperatura
	Produttore
	Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale
	Attenzione

Indirizzi utili

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di assistenza tecnica **www.qiagen.com/Support**, chiamate lo 00800-22-44-6000 o contattate uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito **www.qiagen.com**).

Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* RAS Extension Pyro

Se il RAS Extension Plug-in Report è installato, nel browser dei collegamenti del software PyroMark Q24 saranno disponibili gli allestimenti predefiniti dei test per i codoni 59/61, 117 e 146 KRAS e per i codoni 12/13, 59, 61, 117 e 146 NRAS. Seguire il percorso "Example Files/PyroMark Setups/RAS Extension". In questo caso non è necessario eseguire la procedura seguente.

Il RAS Extension Plug-in Report è disponibile per il download dalla pagina del catalogo corrispondente sul sito www.qiagen.com, nella scheda "Product Resources" della sezione "Protocol Files".

È ampiamente preferibile utilizzare il RAS Extension Plug-In Report rispetto all'analisi manuale.

Dopo l'installazione del plug-in, oppure ogni volta che viene installato o aggiornato un nuovo software nel computer, è necessario verificare che il plug-in funzioni come descritto nella guida rapida RAS Extension Plug-In Quick Guide.

Se RAS Extension Plug-In Report non è installato, è necessario configurare manualmente il file del dosaggio prima di eseguire il test *therascreen* RAS Extension Pyro per la prima volta. Allestire il dosaggio per i codoni 59/61, 117 e 146 KRAS e per i codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 NRAS utilizzando il software PyroMark Q24 nel modo descritto di seguito.

Procedura

1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ).

2. La Tabella 9 mostra le sequenze da analizzare per tutti gli otto dosaggi RAS Extension Pyro. Digitare la sequenza specifica del dosaggio nel campo "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare).
3. Dopo il processo è possibile modificare la "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare) per rilevare mutazioni in altre posizioni (vedere "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 35).
4. Per verificare se le mutazioni sono presenti in altri nucleotidi, modificare la sequenza da analizzare facendo riferimento alla Tabella 10. È possibile cambiare la sequenza da analizzare al termine del processo (se non è bloccato).

Nota: assicurarsi che la soglia per l'altezza del picco singolo sia impostata su 30 RLU. Controllare inoltre che il fattore di riduzione del picco A sia impostato su 0,86 per l'analisi del codone 61 NRAS.

5. Specificare manualmente l'ordine di dispensazione facendo riferimento alla Tabella 9.
Nota: non utilizzare il pulsante "Generate Dispensation Order" (Genera ordine di dispensazione). È necessario specificare manualmente sia la sequenza da analizzare, sia l'ordine di dispensazione.
6. 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).
7. Fare clic su  nella barra degli strumenti e salvare il dosaggio come "KRAS 59/61"
o "KRAS 117" o "KRAS 146" o "NRAS 12/13" o "NRAS 59" o "NRAS 61"
o "NRAS 117" o "NRAS 146".

Tabella 15. Configurazione dei dosaggi: sequenza da analizzare e ordine di dispensazione per gli otto dosaggi del kit *therascreen* RAS Extension Pyro

Dosaggio <i>therascreen</i> RAS Extension	Sequenza da analizzare	Ordine di dispensazione
KRAS 59/61	CTCDTGACCTGCTGT	GCTCAGTCAGACTAGCATGA
KRAS 117	ATAAHTGTGA	GATGACTCGTG
KRAS 146	ATCAVCAAAGA	GATCAGCTGAGC
NRAS 12/13	GNTGNTGTGGGAAAAGC	TACGACTCAGCATCGTAGAG
NRAS 59	ACAGNTGGAC	TGACTAGCATGA
NRAS 61	CNAGAAGAGTA	TCGTATCGAGAG
NRAS 117	ABTGTGATT	GACGTGTGA
NRAS 146	CANCCAAGACCA	GCAGTCAGAC

Tabella 16. Mutazioni comuni nel gene KRAS umano rilevate dal kit *therascreen* RAS Extension Pyro con la rispettiva sequenza da analizzare

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	Sequenza da analizzare	ID COSMIC* (V70)
KRAS codone 59 (GCA)			
175G>A	A59T	CTCTTGACCTGNTGT	546
176C>G	A59G	CTCTTGACCTNCTGT	28518
KRAS codone 61 (CAA)			
183A>C	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	554
182A>T	Q61L	CTCTHGACCTGCTGT	553
182A>G	Q61R	CTCTHGACCTGCTGT	552
183A>T	Q61H	CTCDTGACCTGCTGT	555
181C>G	Q61E	CTCTTSACCTGCTGT	550
KRAS codone 117 (AAA)			
351A>C	K117N	ATAAHTGTGA	19940
351A>T	K117N	ATAAHTGTGA	28519
KRAS codone 146 (GCA)			

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	Sequenza da analizzare	ID COSMIC* (V70)
436G>A	A146T	ATCAVCAAAGA	19404
436G>C	A146P	ATCAVCAAAGA	19905
437C>T	A146V	ATCAGBAAAGA	19900

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso il Sanger Institute all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Tabella 17. Mutazioni comuni nel gene NRAS umano rilevate dal kit *therascreen* RAS Extension Pyro con la rispettiva sequenza da analizzare

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	Sequenza da analizzare	ID COSMIC* (V70)
NRAS codone 12 (GGT)			
34G>A	G12S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	563
34G>T	G12C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	562
34G>C	G12R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	561
35G>A	G12D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	564
35G>T	G12V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	566
35G>C	G12A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	565
NRAS codone 13 (GGT)			
37G>A	G13S	NGTNGTGTGGGAAAAGC	571
37G>T	G13C	NGTNGTGTGGGAAAAGC	570
37G>C	G13R	NGTNGTGTGGGAAAAGC	569
38G>A	G13D	GNTGNTGTGGGAAAAGC	573
38G>T	G13V	GNTGNTGTGGGAAAAGC	574
38G>C	G13A	GNTGNTGTGGGAAAAGC	575
NRAS codone 59 (GCT)			
175G>A	A59T	ACA VCTGGAC	578
176C>G	A59G	ACAGNTGGAC	-
NRAS codone 117 (AAG)			
351G>C	K117N	ABTGTGATT	-
351G>T	K117N	ABTGTGATT	-
NRAS codone 61 (CAA)			
181C>A	Q61K	VAAGAAGAGTA	580
182A>G	Q61R	CNAGAAGAGTA	584
182A>T	Q61L	CNAGAAGAGTA	583
183A>T	Q61H	CANGAAGAGTA	585
183A>C	Q61H	CANGAAGAGTA	586

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	Sequenza da analizzare	ID COSMIC* (V70)
183A>G	Q61Q	CANGAAGAGTA	587
NRAS codone 146 (GCC)			
436G>A	A146T	CANCCAAGACCA	27174
436G>C	A146P	CANCCAAGACCA	-
437C>T	A146V	CAGBCAAGACCA	-

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso il Sanger Institute all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/

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



AVVERTENZA

Agenti chimici pericolosi

La soluzione di denaturazione utilizzata con la stazione di lavoro per il vuoto contiene idrossido di sodio, che è irritante per occhi e cute.

Indossare sempre occhiali protettivi, guanti e un camice da laboratorio.

L'autorità 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 dello strumento non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), come definito nelle schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) o nei documenti OSHA*, ACGIH† o COSHH‡ pertinenti.

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.

* 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

1. 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.
2. Gettare via tutte le soluzioni residue nei recipienti.
3. Sciacquare i recipienti con acqua altamente depurata, oppure sostituirli se necessario.
4. Svuotare il contenitore del materiale di scarto.
5. È possibile rimuovere il tappo senza scollegare il tubo.

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

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
<i>therascreen</i> RAS Extension Pyro Kit (24)	Per 24 reazioni: primer di sequenziamento, primer PCR, DNA di controllo non metilato, PyroMark PCR Master Mix, concentrato CoralLoad, tamponi e reagenti	971590
PyroMark Q24 MDx	Piattaforma di rilevazione basata sulle sequenze per sottoporre a pirosequenziamento 24 campioni in parallelo	9001513
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Stazione di lavoro per il vuoto per preparare 24 campioni in parallelo, dal prodotto della PCR al template a filamento singolo	9001515
PyroMark Q24 MDx Software	Software di analisi	9019063
Accessori		
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

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
Prodotti correlati		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 colonne QIAamp MinElute®, proteinasi K, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	56404

Per le informazioni aggiornate sulla licenza 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 possono essere scaricati dal sito www.qiagen.com o richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], CoralLoad[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Pyro[®], Pyrogram[®], PyroMark[®], Pyrosequencing[®], *therascreen*[®] (Gruppo QIAGEN); Analyse-it[®] (Analyse-it Software Ltd); Applied Biosystems[®], Variomag[®] (Thermo Fisher Scientific); Axxygen[®] (Corning Inc.); FrameStar[®] (4titude Ltd); Milli-Q[®] (Merck Millipore Corporation); Sepharose[®] (GE Healthcare); SmartBlock™, ThermoMixer[®] (Eppendorf AG); Windows[®] (Microsoft Corporation).

Contratto di licenza limitata per il kit *therascreen* RAS Extension Pyro

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo pannello e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo pannello 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 pannello 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 pannello e/o ai relativi componenti. Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

16-mag HB-1882-002 © 2016 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com