

Manuale del kit *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Versione 1

IVD

Per uso diagnostico in vitro



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2 **MAT** 1075556IT



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.

Indice generale

Usò previsto	5
Riassunto e spiegazione	5
Principio della procedura	7
Controlli	8
Materiale fornito	9
Contenuto del kit	9
Materiale necessario ma non fornito	10
Avvertenze e precauzioni	13
Informazioni di sicurezza	13
Precauzioni generali	13
Conservazione e gestione dei reagenti	14
Conservazione e manipolazione dei campioni	14
Procedura	15
Isolamento del DNA	15
Protocollo 1: configurazione del processo per il sistema PyroMark Q24	16
Protocollo 2: analisi PCR con i reagenti per PCR inclusi nel kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	19
Protocollo 3: immobilizzazione dei prodotti della PCR su grani Streptavidin Sephrose High Performance	22
Protocollo 4: preparazione dei campioni prima dell'analisi Pyrosequencing sul sistema PyroMark Q24	24
Protocollo 5: esecuzione del sistema PyroMark Q24	28
Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24	31
Interpretazione dei risultati	35
Interpretazione dei risultati dell'analisi e rilevazione delle mutazioni di basso livello	35
Guida alla risoluzione dei problemi	39
Controllo di qualità	42
Limitazioni	42
Caratteristiche prestazionali	42

Limite del bianco e limite di sensibilità	42
Linearità	44
Precisione	46
Valutazione diagnostica	47
Riferimenti bibliografici	49
Simboli	50
Indirizzi utili	50
Appendice A: configurazione dei dosaggi <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	51
Appendice B: svuotamento del contenitore del materiale di scarto e dei recipienti	55
Informazioni per gli ordini	57

Uso previsto

Il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro è un test di rilevazione in vitro di sequenze di acido nucleico che si basa sulla tecnologia Pyrosequencing® per la determinazione quantitativa delle mutazioni nell'esone 9 del gene *KIT* umano e nell'esone 18 del gene *PDGFRA* umano in DNA genomico ottenuto da campioni di tessuto umano.

Il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro fornisce ai medici informazioni utili per la gestione dei pazienti con diagnosi di tumore stromale gastrointestinale (GIST) e per la selezione dei pazienti che hanno maggiori probabilità di trarre beneficio dalle terapie con farmaci che bersagliano le vie di segnale, come l'imatinib. 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.

Questo prodotto non è idoneo per l'uso con campioni di tessuto polmonare.

Riassunto e spiegazione

Il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro viene utilizzato per le misurazioni quantitative delle mutazioni nell'esone 9 del gene *KIT* e nell'esone 18 del gene *PDGFRA* (Figura 1). La rilevazione delle mutazioni nell'esone 9 del gene *KIT* consente di utilizzare la dose appropriata di imatinib. La rilevazione delle mutazioni nell'esone 18 nel gene *PDGFRA* consente di escludere i genotipi meno sensibili o resistenti (1-3).

<i>KIT</i> esone 9	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCTTATTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
<i>PDGFRA</i> esone 18	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Figura 1. Il contesto genomico delle regioni sequenziate dei geni *KIT* e *PDGFRA* umani (ID Ensembl ENSG00000157404 ed ENSG00000134853). Il codone 503 nel gene *KIT* e il codone 842 nel gene *PDGFRA* sono indicati dalle cornici.

Il kit è costituito da due dosaggi: uno è destinato alla rilevazione delle mutazioni nel codone 9 del gene *KIT*, l'altro alla rilevazione delle mutazioni nell'esone 18 del gene *PDGFRA* (Figura 2). Le due regioni vengono amplificate separatamente tramite PCR e sequenziate lungo tutta la regione definita. Le sequenze attorno alle posizioni definite servono da picchi di riferimento e di normalizzazione per la quantificazione e la valutazione della qualità dell'analisi.

Nota: entrambi i dosaggi vengono sequenziati nella direzione diretta (forward).

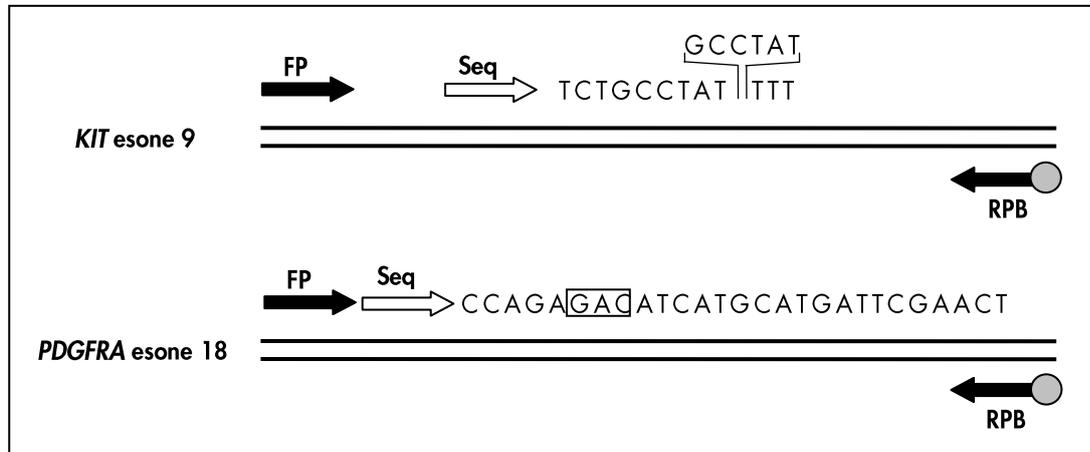


Figura 2. Illustrazione dei dosaggi *KIT*/*PDGFRA*. La sequenza indicata è la sequenza analizzata per un campione wild-type. Sono indicate la posizione e la sequenza della duplicazione 6 bp nell'esone 9 del gene *KIT*. La cornice indica il codone 842 dell'esone 18 del gene *PDGFRA*. **FP:** Forward PCR Primer (primer diretto per PCR); **RPB:** Reverse PCR Primer (primer inverso per PCR) (B indica biotinilazione); **Seq:** primer di sequenziamento.

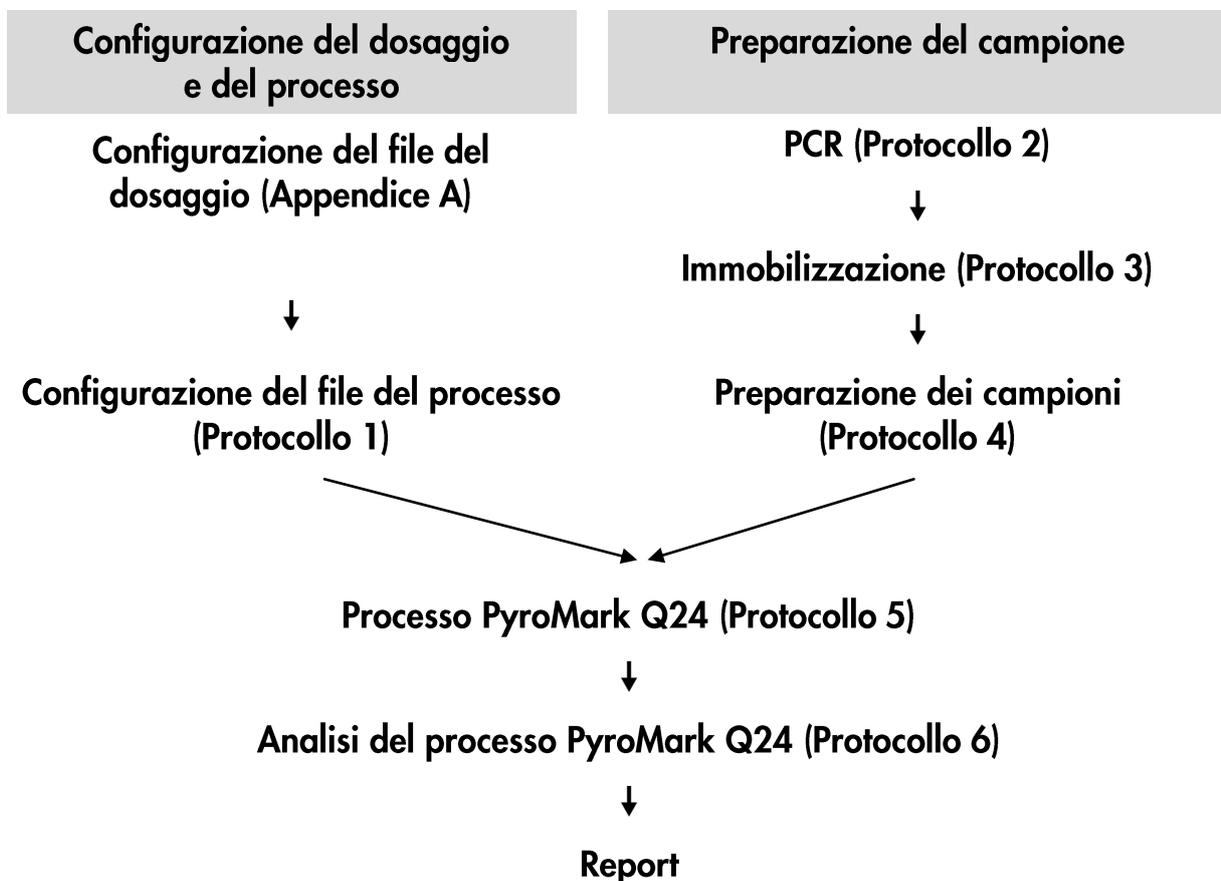
Il prodotto è costituito da una miscela di primer per PCR e da un primer di sequenziamento per ogni dosaggio. I primer vengono forniti in soluzione. Ogni fiala contiene 32 µl di ogni primer o miscela di primer.

Principio della procedura

Il flusso di lavoro seguente illustra la procedura del dosaggio. Dopo avere eseguito la PCR con i primer che hanno come target l'esone 9 del gene *KIT* e l'esone 18 del gene *PDGFRA*, gli ampliconi vengono immobilizzati su 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.

Per analizzare il processo è consigliabile utilizzare il GIST RapidScreen Plug-in Report. È possibile richiedere il GIST RapidScreen Plug-in Report tramite e-mail all'indirizzo pyro.plugin@qiagen.com. È tuttavia possibile analizzare il processo anche utilizzando lo strumento analitico integrato nel sistema PyroMark Q24. È possibile correggere la sequenza da analizzare ("Sequence to Analyze") per la rilevazione di mutazioni rare dopo il processo (vedere "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 31 e "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", pagina 51).

Flusso di lavoro della procedura *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Controlli

Il DNA di controllo non metilato è incluso nel prodotto come controllo positivo per la PCR e le reazioni di sequenziamento. Tale DNA di controllo ha un genotipo wild-type nelle regioni sequenziate da questo kit. La sua funzione è garantire una corretta interpretazione dei risultati e una corretta identificazione delle mutazioni di basso livello (vedere "Interpretazione dei risultati", pagina 31). Includere un campione con il DNA di controllo non metilato per ogni dosaggio in ogni processo Pyrosequencing.

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

Materiale fornito

Contenuto del kit

therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit (scatola 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	(24)
N° di catalogo	971510
N° di reazioni	24
Seq Primer KIT exon 9 (Primer di sequenziamento esone 9 KIT)	32 µl
Seq Primer PDGFRA exon 18 (Primer di sequenziamento esone 18 PDGFRA)	32 µl
PCR Primer Mix KIT exon 9 (Miscela di primer per PCR esone 9 KIT)	32 µl
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (Miscela di primer per PCR esone 18 PDGFRA)	32 µl
PyroMark PCR Master Mix, 2x (Soluzione Master Mix per PCR PyroMark 2x)	850 µl
CoralLoad® Concentrate, 10x (Concentrato CoralLoad 10x)	1,2 ml
H ₂ O	3 x 1,9 ml
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (DNA di controllo non metilato, 10 ng/µl)	100 µl

Tamponi e reagenti *therascreen Pyro* (scatola 2/2)

Tamponi e reagenti <i>therascreen Pyro</i>	
PyroMark Binding Buffer (Tampono di legame PyroMark)	10 ml
PyroMark Annealing Buffer (Tampono di annealing PyroMark)	10 ml
PyroMark Denaturation Solution (Soluzione di denaturazione PyroMark)*	250 ml
PyroMark Wash Buffer, 10x (Tampono di lavaggio PyroMark 10x)	25 ml
Enzyme Mixture (Miscela enzimatica)	1 fiala
Substrate Mixture (Miscela di substrato)	1 fiala
dATP α S	1 180 μ l
dCTP	1 180 μ l
dGTP	1 180 μ l
dTTP	1 180 μ l
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (inglese)	1

* Contiene idrossido di sodio.

Materiale necessario ma non fornito

Quando si opera con sostanze chimiche, 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 15)
- 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 PCR)
- Piastre per PCR a 24 pozzetti (vedere "Piastre a 24 pozzetti raccomandate", pagina 12)
- Pellicola adesiva

Attrezzatura

- Pipette (regolabili)†
- Microcentrifuga da tavolo†
- Termociclatore† e provette idonee per PCR
- PyroMark Q24 (n° cat. 9001513 o 9001514)†‡
- Software PyroMark Q24 (n° cat. 9019063 o 9019062)‡
- Piastra PyroMark Q24 (n° cat. 979201)‡
- Cartuccia PyroMark Q24 (n° cat. 979202)‡
- Stazione del vuoto PyroMark Q24 (n° cat. 9001515 o 9001517)†‡
- Miscelatore per piastre† per immobilizzazione su grani (vedere "Agitatori per piastre raccomandati", pagina 12)
- Blocco riscaldante† in grado di raggiungere 80°C

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

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

‡ 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.

Piastre a 24 pozzetti raccomandate

Con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro è consigliabile utilizzare le piastre a 24 pozzetti indicate nella Tabella 1.

Tabella 1. Piastre a 24 pozzetti raccomandate per l'uso con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Produttore	Prodotto	Numero di catalogo
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Agitatori per piastre raccomandati

Con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro è consigliabile utilizzare gli agitatori orbitali per piastre indicati nella Tabella 2.

Tabella 2. Agitatori per piastre raccomandati per l'uso con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Produttore	Prodotto	Numero di catalogo
Eppendorf	Termomiscelatore comfort (strumento base)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	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

Informazioni di sicurezza

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e relativi componenti.

Le seguenti frasi precauzionali e di rischio sono valide per i componenti del kit *therascreen* G1ST RapidScreen 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.

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.
- I componenti di questo prodotto sono sufficienti per analizzare 24 reazioni in un massimo di 5 processi indipendenti.
- 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* GIST RapidScreen Pyro viene consegnato in due scatole. Il contenuto della scatola 1/2 del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro viene conservato in ghiaccio secco durante la spedizione. Subito dopo la consegna, conservare i reagenti PyroMark PCR Master Mix, concentrato CoralLoad, DNA di controllo non metilato e tutti i primer a una temperatura compresa tra -15 e -30°C.

Il contenuto della scatola 2/2 dei tamponi e dei reagenti *therascreen* Pyro (tamponi, miscela enzimatica, miscela di substrato, dATP α S, 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 -30°C. I reagenti congelati non devono essere sottoposti a più di 6 cicli di congelamento-scongelo.

Nota: i nucleotidi non devono essere congelati.

Il kit *therascreen* GIST RapidScreen 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 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. I campioni ematici raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante non devono essere utilizzati. L'eparina compromette la PCR.

Procedura

Isolamento del DNA

Le prestazioni del sistema sono state determinate utilizzando i kit EZ1[®] DNA Tissue e QIAamp[®] 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.

L'uso dei kit QIAGEN descritti nella Tabella 3 sono stati validati per la purificazione del DNA ottenuto dai tipi di campioni umani analizzati con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Eseguire la purificazione del DNA nel rispetto delle istruzioni contenute nei manuali dei kit.

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

Materiale campione	Kit per l'estrazione degli acidi nucleici	N° di catalogo (QIAGEN)
Tessuto incluso in paraffina	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sangue	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit [†]	61104

* Seguire il protocollo per l'uso con tessuto incluso in paraffina. Il prodotto EZ1 DNA Tissue Kit deve essere utilizzato in combinazione con EZ1 Advanced (n° di cat. 9001410 o 9001411) ed EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018298), con EZ1 Advanced XL (n° di cat. 9001492) ed EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9018700) oppure con BioRobot[®] EZ1 (n° di cat. 9000705; non più disponibile) ed EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° di cat. 9015862).

[†] 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 un campione wild-type 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

- Se il GIST RapidScreen Plug-in Report non è stato installato, creare una configurazione del dosaggio (vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", pagina 51). Questa operazione deve essere effettuata una sola volta, prima di eseguire i dosaggi *therascreen* GIST RapidScreen Pyro per la prima volta. Se il GIST RapidScreen Plug-in Report è stato installato, è possibile utilizzare le configurazioni dei dosaggi predefinite, disponibili nel browser dei collegamenti del software PyroMark Q24, nel percorso "Example Files/PyroMark Setups/GIST". È possibile richiedere il GIST RapidScreen Plug-in Report tramite e-mail all'indirizzo pyro.plugin@qiagen.com.

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. **Allestire la piastra aggiungendo i dosaggi sia per l'esone 9 del gene KIT che per l'esone 18 del gene PDGFRA nei pozzetti che corrispondono ai campioni da analizzare.**

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

Nota: includere un campione con il DNA di controllo non metilato per ogni dosaggio in ogni processo Pyrosequencing (vedere "Controlli", pagina 8).

4. Quando il processo è configurato e pronto per essere avviato sul sistema PyroMark Q24, stampare un elenco dei volumi richiesti per quanto riguarda la miscela enzimatica, la miscela di substrato e i nucleotidi, oltre alla 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 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 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 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 i numeri di lotto delle scatole 1 e 2 del kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen 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 imprevisti con il kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
"Run note" (Nota sul processo):	Facoltativo: 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 per PCR inclusi nel kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Questo protocollo prevede l'uso del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro per eseguire le amplificazioni PCR di una regione contenente l'esone 9 del gene *KIT* e, separatamente, di una regione contenente l'esone 18 del gene *PDGFRA*.

Punti importanti prima di iniziare

- La DNA polimerasi HotStarTaq® contenuta nella miscela 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. Scongellare tutti i componenti necessari (vedere la Tabella 4).

Miscelare con cura prima dell'uso.

2. Preparare una miscela di reazione per ogni set di primer per PCR, facendo riferimento 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
Master Mix per PCR PyroMark, 2x	12,5 µl
Concentrato CoralLoad, 10x	2,5 µl
Primer per PCR KIT esone 9 ○ Primer per PCR PDGFRA esone 18	1 µl
Acqua (H ₂ O, fornita)	4 µl
Volume totale	20 µl

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 templato (2-10 ng di DNA genomico) nelle singole provette per PCR (Tabella 5), quindi miscelare con cura.

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

Nota: includere un campione con il DNA di controllo non metilato per ogni dosaggio in ogni processo Pyrosequencing (vedere "Controlli", pagina 8).

Tabella 5. Preparazione della PCR

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

5. Programmare il termociclatore in base alle istruzioni del produttore, facendo riferimento alle condizioni descritte nella Tabella 6.

Tabella 6. Protocollo di ciclaggio ottimizzato

			Commenti
Fase di attivazione iniziale:	15 minuti	95°C	La DNA polimerasi HotStarTaq viene attivata da questa fase di riscaldamento.
Ciclaggio a 3 fasi:			
Denaturazione	20 secondi	95°C	
Annealing	30 secondi	53°C	
Estensione	20 secondi	72°C	
Numero di cicli	42		
Estensione finale:	5 minuti	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 22.

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 templato su grani di streptavidina (Streptavidin Sepharose High Performance, di GE Healthcare) 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 seguendo le istruzioni della 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/campione
Tampone di legame PyroMark	40 μ l
Streptavidin Sepharose High Performance	1 μ l
Acqua (H ₂ O, fornita)	29 μ l
Volume totale	70 μl

Nota: questo protocollo riguarda i prodotti Streptavidin Sepharose High Performance con numero di lotto 10057037 o superiore. Quando si utilizzano grani di Streptavidin Sepharose High Performance con un numero di lotto inferiore a 10057037, il volume di grani per campione utilizzati deve essere aumentato fino a 2 μ l e il volume di acqua deve essere ridotto di conseguenza.

3. Aggiungere 70 μ l 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 16).

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. Evitare lo spin down della soluzione Master Mix.

4. Aggiungere 10 μ l 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 per PCR inclusi nel kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro", pagina 19).

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

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 24.

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'annealing 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 2 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 16), a seconda della regione da analizzare (esone 9 *KIT* o esone 18 *PDGFRA*).
- Non abbreviare il periodo di raffreddamento dei campioni dopo averli riscaldati a 80°C.
- 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 ogni primer di sequenziamento (esone 9 *KIT* ed esone 18 *PDGFRA*) nel tampone di annealing PyroMark, secondo le indicazioni della Tabella 8.**

Preparare un volume del primer di sequenziamento diluito extra 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 altro primer di sequenziamento.

Tabella 8. Esempio di diluizione dei primer di sequenziamento

Componente	Volume/campione	Volume per 9 + 1 reazioni
Tampone di annealing PyroMark	24,2 µl	242 µl
Primer di sequenziamento KIT esone 9		
oppure	0,8 µl	8 µl
Primer sequenziamento PDGFRA esone 18		
Volume totale	25 µl	250 µl

- 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 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. 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 per 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 aprendo 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. Estrarre lo strumento del vuoto con cautela.**

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

Ispezionare la piastra per PCR per assicurarsi che lo strumento del vuoto abbia aspirato completamente 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 lo strumento del vuoto e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo da drenare tutto il liquido 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, chiudere l'interruttore del vuoto sullo strumento (Off).
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.
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 per 10 secondi.
14. Lavare le sonde del filtro immergendole nell'acqua altamente depurata (recipiente 5; Figura 3) e applicando il vuoto. Sciacquare le sonde con 70 ml di acqua altamente depurata.
15. Sollevare lo strumento del vuoto e mantenerlo reclinato di oltre 90° in senso verticale per 5 secondi, in modo da drenare tutto il liquido dalle sonde del filtro (Figura 4).
16. Chiudere l'interruttore del vuoto (Off) e sistemare lo strumento del vuoto nella posizione di sosta (P).
17. Spegnerla pompa del vuoto.
Al termine della giornata di lavoro è necessario smaltire i rifiuti liquidi e le soluzioni residue e verificare 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 55.
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.
20. Procedere con il "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'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 16), contiene informazioni sui volumi di nucleotidi, tampone di enzima e tampone di substrato necessari per un processo specifico.
- Utilizzare puntali monouso senza filtri idrofobici per caricare la cartuccia e consentire il corretto funzionamento della stessa.

Procedura

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

Non agitare in vortex.

Per assicurarsi 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).**

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

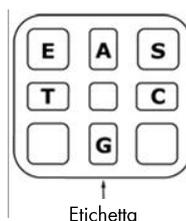


Figura 5. Illustrazione della cartuccia PyroMark Q24 vista dall'alto. Le annotazioni corrispondono all'etichetta sulle fiale dei reagenti. Aggiungere la miscela enzimatica (**E**), la miscela di substrato (**S**) e i nucleotidi (**A**, **T**, **C**, **G**) rispettando i volumi indicati nel report "Pre 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 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 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 31.**

Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24

Questo protocollo descrive l'analisi mutazionale di un processo GIST RapidScreen 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 AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (👉) nel browser dei collegamenti.
4. Sono disponibili 2 metodi per analizzare il processo. Se si utilizza il GIST RapidScreen Plug-in Report, andare al passaggio 5. Se si utilizza l'analisi AQ integrata nel sistema PyroMark Q24, andare al passaggio 6.

Nota: si consiglia vivamente di utilizzare il GIST RapidScreen Plug-in Report per documentare e interpretare i risultati. È possibile richiedere il GIST RapidScreen Plug-in Report tramite e-mail all'indirizzo pyro.plugin@qiagen.com. Il report garantisce che verranno utilizzati i valori LOD appropriati (Tabella 9) e diverse sequenze da analizzare ("Sequence to Analyze") per rilevare tutte le mutazioni automaticamente.

Nota: due mutazioni complesse nell'esone 18 del gene *PDGFRA* (2526_2538>G e 2524_2526 GAC>TAT) non possono essere analizzate con la modalità AQ del software PyroMark Q24. Si consiglia di utilizzare il GIST RapidScreen Plug-in Report per analizzare le mutazioni complesse nell'esone 18 del gene *PDGFRA*.

5. **Uso del GIST RapidScreen Plug-in Report:**
Per generare un report, selezionare "AQ Add On Reports/GIST" (Report/GIST add-on AQ) da "Reports" (Report) nel menu (Figura 6).

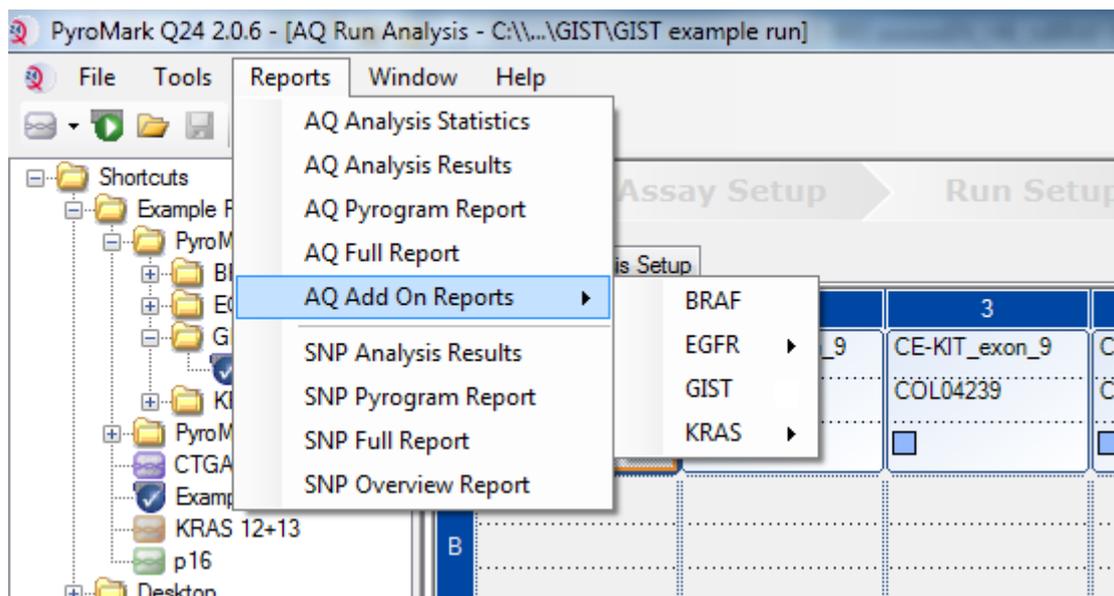


Figura 6. Menu GIST RapidScreen Plug-in Report.

I pozzetti verranno analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni per le quali vengono forniti i valori LOD nella Tabella 9. 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	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29,6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4,5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52,2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		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. GIST RapidScreen Plug-in Report.

6. 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 di qualità sono visualizzati sopra alla posizione della variabile nel tracciato Pyrogram®. 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. Nella configurazione dei dosaggi impostare 30 RLU come "required peak height for passed quality" (altezza di picco richiesta per controllo di qualità superato). Vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* GIST RapidScreen Pyro" e il manuale utente *PyroMark Q24 User Manual*.

Nota: per documentare e interpretare la quantificazione allelica, è necessario 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.

Ripetizione dell'analisi per i campioni senza mutazioni rilevate con "Sequence to analyze" (Sequenza da analizzare) standard o con valutazione della qualità "Check" o "Failed" (Controllare o Fallita)

La sequenza da analizzare standard definita nella configurazione dell'analisi ha come target la duplicazione 6 bp nell'esone 9 del gene *KIT* e il punto di mutazione più frequente nel codone 842 (GAC>GTC) dell'esone 18 del gene *PDGFRA* (vedere l'Appendice A, pagina 51). Se un campione contiene una mutazione meno frequente nell'esone 18 *PDGFRA* del gene, è possibile modificare la sequenza in modo da analizzare lo stato mutazionale di tale mutazione, come descritto nell'Appendice A.

Due mutazioni complesse nell'esone 18 del gene *PDGFRA* (2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT) non possono essere analizzate con la modalità AQ del software *PyroMark Q24*. Si consiglia di utilizzare il GIST RapidScreen Plug-in Report per analizzare le mutazioni complesse nell'esone 18 del gene *PDGFRA*.

Si raccomanda vivamente di ripetere l'analisi per tutti i campioni nei quali non sia stata rilevata nessuna mutazione con la "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare) standard e per tutti i campioni che abbiano ottenuto una valutazione della qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Controllo non superato). Le valutazioni di qualità "Check" e "Failed" potrebbero indicare una mutazione rara che non viene rilevata dalla sequenza da analizzare standard, ma che potrebbe determinare picchi di riferimento inattesi.

Per ripetere l'analisi selezionando mutazioni meno frequenti come target, scegliere "Analysis Setup" (Configurazione analisi) e impostare nel campo "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare) le varianti descritte 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 *KIT/PDGFR*A umani sono disponibili online, sul sito del Sanger Institute:
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.

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

Si raccomanda vivamente di includere il DNA di controllo non metilato in ogni processo a scopo di confronto e come 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.

- 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 GIST RapidScreen Plug-in Report (vedere il passaggio 5 del "Protocollo 6: analisi di un processo PyroMark Q24", pagina 31) 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 "wild-type". 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 con 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. Riprodotto in duplicato con lo stesso risultato e campione wild-type < 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 deve essere ritenuta indicativa di una mutazione.

Nota: per l'interpretazione dei risultati è consigliabile utilizzare il GIST RapidScreen 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: la scelta della terapia per i pazienti oncologici non deve basarsi unicamente sullo stato mutazionale dell'esone 9 del gene *KIT* e dell'esone 18 del gene *PDGFRA*.

Tabella 9. Valori LOB e LOD determinati per mutazioni specifiche

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (v58)
Esone 9 KIT				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Esone 18 PDGFRA				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 oppure [‡]	D842_H845del oppure [‡]	2,2	5,2	737 oppure [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

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

[†] Le mutazioni 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 rispettivamente determinano la stessa sostituzione di aminoacido.

[‡] Le mutazioni 2524_2535del12 e 2526_2537del12 determinano la stessa sostituzione di acido nucleico.

[§] La mutazione 2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT non può essere analizzata con la modalità AQ del software PyroMark Q24.

Risultati rappresentativi

Nelle Figure 8-11 sono illustrati risultati rappresentativi dei tracciati Pyrogram.

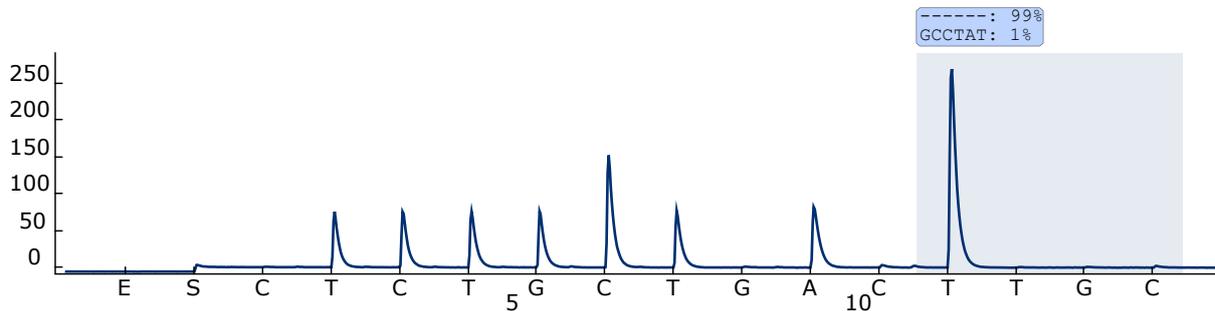


Figura 8. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo wild-type nell'esone 9 del gene *KIT* con sequenza da analizzare *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTA* che ha come target la duplicazione 6 bp dopo il codone 503.

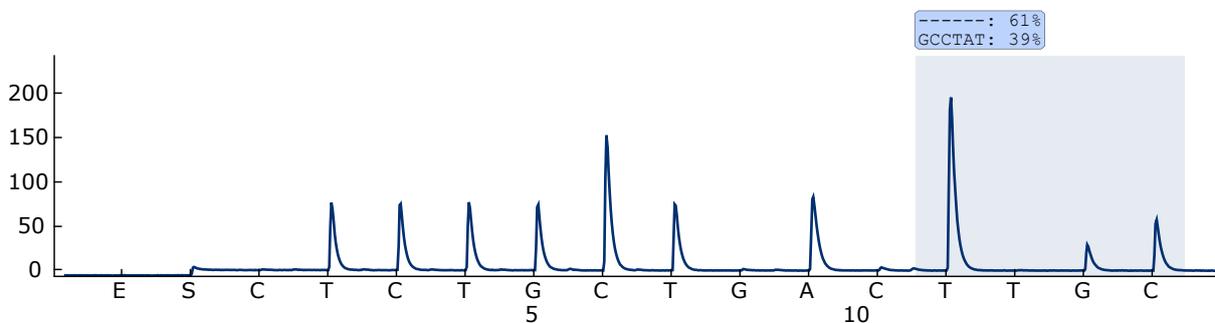


Figura 9. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con duplicazione GCCTAT dopo il codone 503 nell'esone 9 del gene *KIT* con sequenza da analizzare *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTA*.

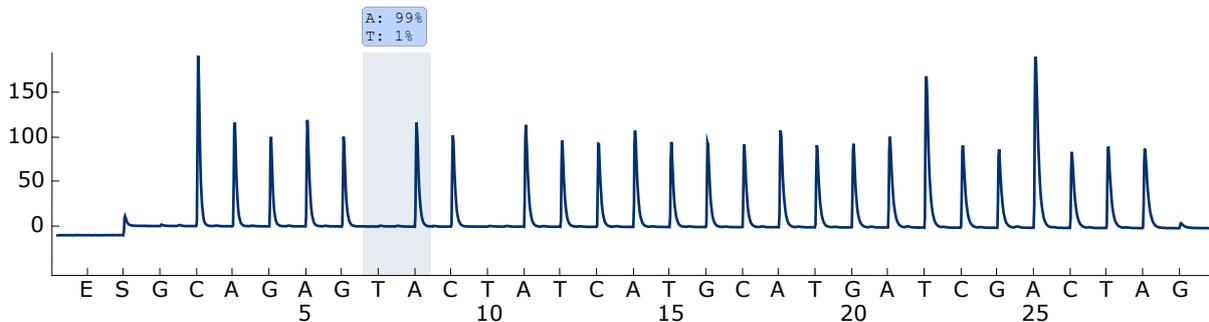


Figura 10. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con genotipo wild-type nell'esone 18 del gene *PDGFRA* con sequenza da analizzare *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* che ha come target la mutazione GAC>GTC nel codone 842 (nucleotide 2525).

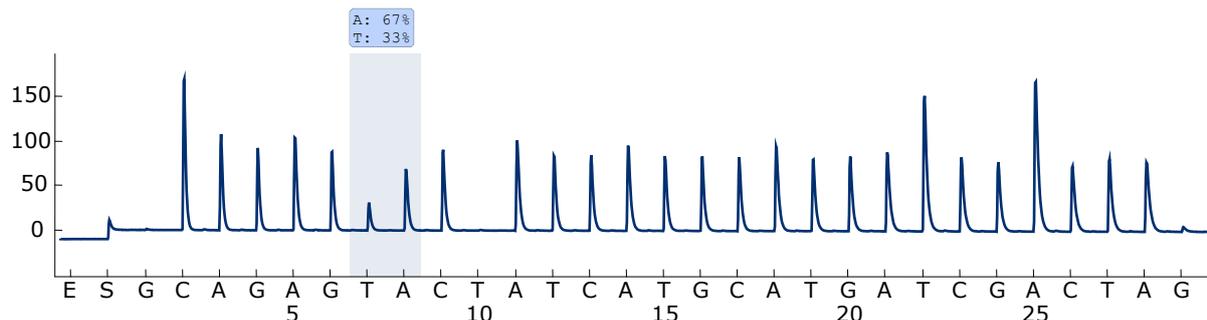


Figura 11. Pirogramma ottenuto dall'analisi di un campione con una mutazione GAC>GTC nel codone 842 (nucleotide 2525) nell'esone 18 del gene *PDGFRA* con la sequenza da analizzare CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

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).

Fare riferimento al manuale utente *PyroMark Q24 User Manual* per risolvere i problemi generali dello strumento.

Commenti e suggerimenti

Segnali nel controllo senza template (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 template. |
| 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. |

Commenti e suggerimenti

Sequenza scarsa o inattesa

DNA genomico di bassa qualità

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).

Risultato "Check" o "Failed"

a) Altezza del picco bassa

Errori di gestione relativi alla configurazione 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) usata per l'immobilizzazione consenta l'aspirazione completa dei campioni.

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.

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 Pyrogram (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.

b) Mutazione non definita nella sequenza da analizzare

Correggere la sequenza da analizzare nella configurazione del dosaggio (vedere "Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen GIST RapidScreen Pyro*", pagina 51), quindi ripetere il processo.

Commenti e suggerimenti

- c) Mutazione rara inattesa
Un pattern inatteso di picchi può causare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Fallita). 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.
- d) Avvertenza relativa 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 mutazioni rare, è consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Fondo elevato

- a) Conservazione impropria dei nucleotidi
Conservare i nucleotidi a 2-8°C. La conservazione tra -15 e -30°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").

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|--|
| b) Conservazione o diluizione errata dei reagenti | Preparare i reagenti 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 della PCR, alla programmazione del ciclatore PCR o alla preparazione del campione prima dell'analisi di pirosequenziamento possono determinare l'assenza di segnali. Eseguire il test funzionale delle sonde del filtro seguendo le istruzioni descritte 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* GIST RapidScreen 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.

Per ottenere risultati ottimali dalla PCR, è necessario osservare scrupolosamente le istruzioni fornite nel manuale utente. Prestare attenzione alle date di scadenza stampate sulle confezioni e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti.

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 rilevazione (limit of detection, LOD) per un certo numero di mutazioni utilizzando miscele di plasmidi (Tabella 10). I valori LOB e LOD sono stati determinati 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 α e β (rispettivamente falso positivo e falso negativo) sono stati impostati sul 5%. I valori LOD per alcune rare delezioni nell'esone 18 del gene *PDGFRA* sono stati calcolati aggiungendo al valore LOB 3 deviazioni standard di misurazioni del bianco. I valori LOD sono stati fissati ad almeno 3 unità % sopra il valore LOB.

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* (v58)
Esone 9 <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Esone 18 <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 oppure [‡]	D842_H845del oppure [‡]	2,2	5,2	737 oppure [‡]
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

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

† Le mutazioni 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 rispettivamente determinano la stessa sostituzione di aminoacido.

‡ Le mutazioni 2524_2535del12 e 2526_2537del12 determinano la stessa sostituzione di acido nucleico.

§ I valori LOD per queste delezioni nell'esone 18 del gene *PDGFRA* sono stati determinati aggiungendo al valore LOB 3 deviazioni standard di misurazioni del bianco.

¶ La mutazione 2526_2538>G non può essere analizzata con la modalità AQ del software PyroMark Q24.

Linearità

La linearità è stata definita utilizzando miscele di plasmidi con sequenza wild-type o sequenza mutante per la duplicazione 1509_1510insGCCTAT nell'esone 9 del gene *KIT* e la mutazione 2525A>T nell'esone 18 del gene *PDGFRA*. I plasmidi sono stati miscelati in modo proporzionale per generare 4 livelli di mutazione (5, 10, 30 e 50%). Ogni miscela è stata analizzata con 3 diversi lotti del kit *therascreen* GIST RapidScreen 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-A "Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline" utilizzando il software Analyse-it® versione 2.21 e sono illustrati nelle Figure 12 e 13.

I risultati ottenuti sono lineari entro i limiti di non linearità ammissibili di 5 unità % nell'intervallo analizzato che è pari al 5-50% del livello di mutazione.

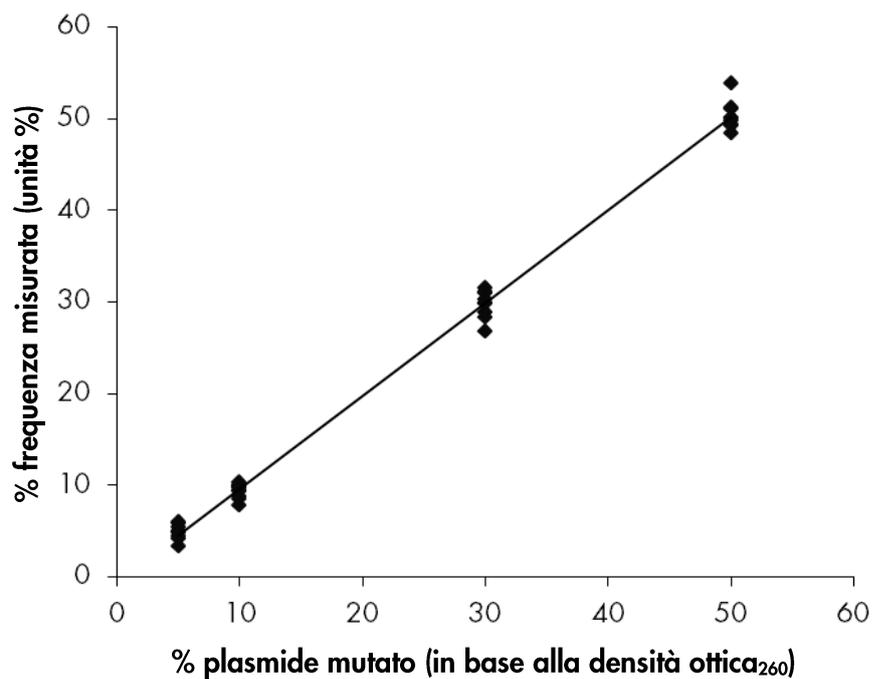


Figura 12. Linearità della duplicazione 1509_1510insGCCTAT nell'esone 9 del gene *KIT*.

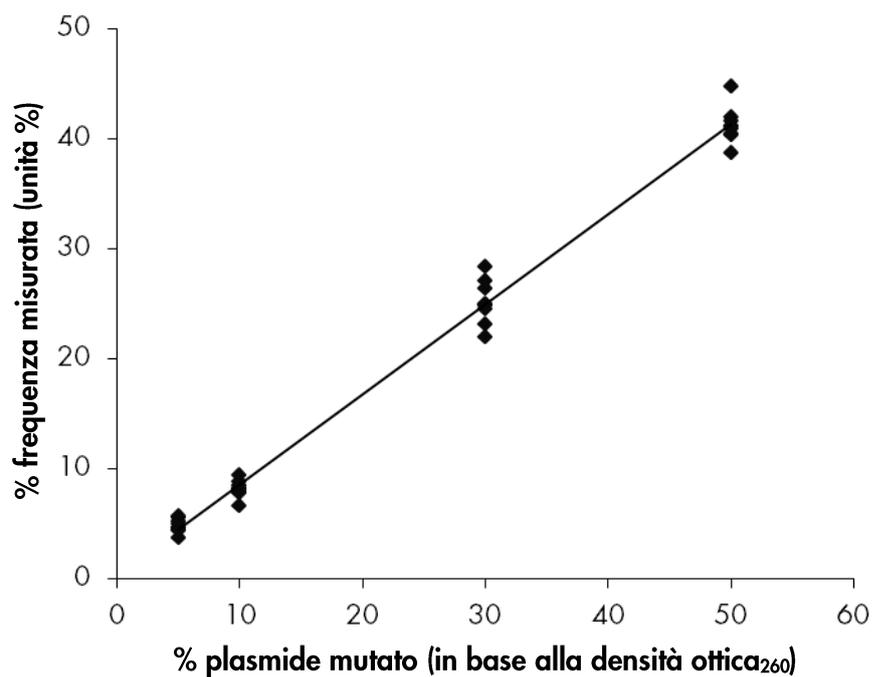


Figura 13. Linearità della mutazione 2525A>T nell'esone 18 del gene *PDGFRA*.

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* GIST RapidScreen Pyro). La precisione intermedia (variabilità nello stesso laboratorio) è stata determinata in 3 processi eseguiti nello stesso laboratorio nell'arco di 3 giornate di lavoro, utilizzando operatori, strumenti PyroMark Q24 e lotti del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro differenti. La riproducibilità (variabilità tra laboratori) è stata calcolata partendo da 2 processi, ciascuno eseguito in un laboratorio interno ed esterno utilizzando lotti differenti del kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Le stime relative alla precisione sono espresse come deviazione standard dalle frequenze di mutazione misurate in unità % (Tabella 11). La ripetibilità, la precisione intermedia e la riproducibilità per la duplicazione 1509_1510insGCCTAT nell'esone 9 del gene *KIT* hanno prodotto rispettivamente i risultati 0,8-1,6, 0,5-1,5 e 0,7-1,9 unità % entro l'intervallo misurato di 5-50% relativo al livello di mutazione. La ripetibilità, la precisione intermedia e la riproducibilità per la mutazione 2525A>T nell'esone 18 del gene *PDGFRA* hanno prodotto rispettivamente i risultati 0,6-1,9, 0,6-3,7 e 0,5-2,4 unità % entro l'intervallo misurato di 5-50% relativo al livello di mutazione.

Tabella 11. Precisione della duplicazione 1509_1510insGCCTAT nell'esone 9 del gene *KIT**

% plasmide mutato [†]	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

* Tutti i valori sono espressi in unità %. DS: deviazione standard (n=9).

[†] In base alla lettura OD₂₆₀

Tabella 12. Precisione della mutazione 2525A>T nell'esone 18 del gene *PDGFRA*[‡]

% plasmide mutato [§]	Ripetibilità		Precisione intermedia		Riproducibilità	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

[‡] Tutti i valori sono espressi in unità %. DS: deviazione standard (n=9).

[§] In base alla lettura OD₂₆₀.

Valutazione diagnostica

Il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro è stato valutato in confronto con il sequenziamento di Sanger. Il DNA è stato estratto da 100 campioni tumorali GIST FFPE ed è stato analizzato per rilevare eventuali mutazioni nell'esone 9 del gene *KIT* e nell'esone 18 del gene *PDGFRA*.

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Le analisi sono state eseguite con il kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro su uno strumento PyroMark Q24. Il sequenziamento di Sanger è stato eseguito su uno strumento Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Su 100 campioni analizzati, è stato possibile determinare lo stato mutazionale dell'esone 9 del gene *KIT* (Figura 13) e dell'esone 18 del gene *PDGFRA* (Figura 14) con entrambi i metodi.

Tabella 13. Risultati dei campioni tumorali GIST analizzati con riferimento all'esone 9 del gene *KIT*

Esone 9 <i>KIT</i>		Sequenziamento di Sanger		
		Nessuna mutazione rilevata	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Totale
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nessuna mutazione rilevata	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Totale	92	8	100

Tabella 14. Risultati dei campioni tumorali GIST analizzati con riferimento all'esone 18 del gene *PDGFRA*

Esone 18 <i>PDGFRA</i>		Sequenziamento di Sanger				Totale
		WT	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Nessuna mutazione rilevata	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Totale	93	2	3	2	100

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 dell'analisi Pyrosequencing sono stati analizzati utilizzando il BRGIST RapidScreen AF Plug-in Report.

Riferimenti bibliografici

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

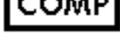
Per un elenco bibliografico completo, è possibile consultare online il QIAGEN Reference Database sul sito www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Citazioni

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

	Contenuto sufficiente per <N> test
	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, è possibile visitare il sito del servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000 o contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o il sito www.qiagen.com).

Appendice A: configurazione dei dosaggi *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Se è stato installato il GIST RapidScreen Plug-in Report, è possibile utilizzare le configurazioni dei dosaggi predefinite per l'esone 9 del gene *KIT* e l'esone 18 del gene *PDGFRA*, disponibili nel browser dei collegamenti del software PyroMark Q24, nel percorso "Example Files/PyroMark Setups/GIST". Non è necessario eseguire la procedura seguente. È possibile richiedere il GIST RapidScreen Plug-in Report all'indirizzo pyro.plugin@qiagen.com.

È ampiamente preferibile utilizzare il GIST RapidScreen Plug-in Report rispetto all'analisi manuale. Le mutazioni complesse dell'esone 18 del gene *PDGFRA* non possono essere aggiunte manualmente ad una sequenza da analizzare e devono invece essere analizzate con il GIST RapidScreen Plug-in Report. Dopo l'installazione del plug-in, oppure ogni volta che viene installato o aggiornato un nuovo software nel computer del laboratorio o ufficio, è necessario verificare che il plug-in funzioni come descritto nella guida rapida GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide.

Se il GIST RapidScreen Plug-in Report non è stato installato, è necessario configurare manualmente i file dei dosaggi prima di eseguire i test *therascreen* GIST RapidScreen Pyro per la prima volta. Configurare il dosaggio per l'esone 9 del gene *KIT* e per l'esone 18 del gene *PDGFRA* utilizzando il software PyroMark Q24, come descritto in precedenza.

Procedura

Esone 9 *KIT*

A1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ).

A2. Immettere manualmente il seguente "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione):
CTCTGCTGACTTGC

A3. Digitare la seguente sequenza in "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare):
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA

La duplicazione 6 bp GCCTAT dopo il codone 503 nell'esone 9 del gene *KIT* sarà rilevata utilizzando questa sequenza da analizzare.

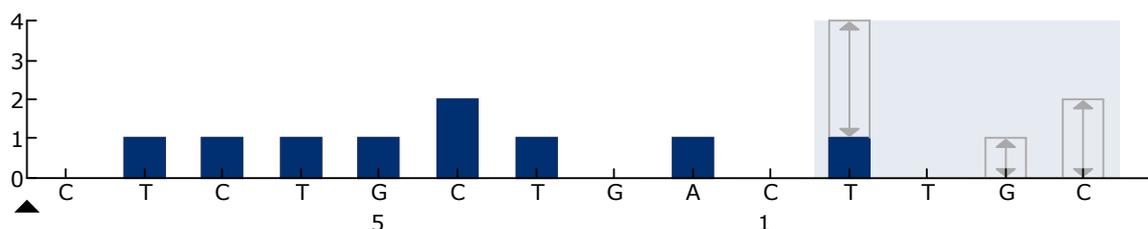


Figura 14. Istogramma per l'esone 9 del gene *KIT* con la sequenza da analizzare *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTA* che ha come target la duplicazione 6 bp dopo il codone 503.

- A4. 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).
- A5. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi salvare il dosaggio come "KIT esone 9".

Esone 18 *PDGFRA*

- A1. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ).
- A2. Immettere manualmente il seguente "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione):
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3. Digitare la seguente sequenza in "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare):
CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT

La mutazione GAC>GTC più frequente nel codone 842 (nucleotide 2525) dell'esone 18 del gene *PDGFRA* sarà rilevata utilizzando questa sequenza da analizzare.

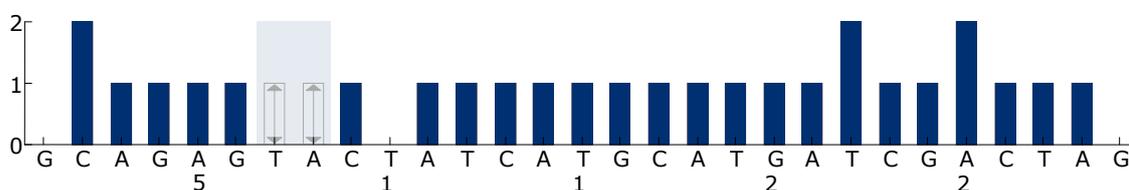


Figura 15. Istogramma per l'esone 18 del gene *PDGFRA* con la sequenza da analizzare *CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT* che ha come target la mutazione GAC>GTC nel codone 842 (nucleotide 2525).

Dopo il processo è possibile modificare la sequenza da analizzare per rilevare ulteriori mutazioni del nucleotide 2524 (codone 842) oltre a 9 delezioni e mutazioni complesse nella regione dei codoni 842-847.

Per verificare se sono presenti le seguenti mutazioni, modificare la sequenza da analizzare facendo riferimento alla Tabella 15.

Nota: durante la configurazione del dosaggio, è possibile ignorare l'avvertenza "Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations" (Quantificazione incerta: servono più di 5 dispensazioni per la posizione variabile).

Nota: assicurarsi che la soglia per l'altezza del picco singolo sia impostata su 30 RLU.

- A4. 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).**
- A5. Fare clic su  nella barra degli strumenti, quindi salvare il dosaggio come "PDGFRA esone 18".**

Tabella 15. Mutazioni comuni rilevate dal kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro utilizzando una diversa sequenza da analizzare

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	Sequenza da analizzare
Esone 9 KIT		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTAA*
Esone 18 PDGFRA		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 oppure [‡] 2526_2537del12	D842_H845del oppure [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	– [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	– [§]

* Sequenza da analizzare standard.

[†] Le mutazioni 2524G>T e 2524_2526GAC>TAT e 2526_2537del12 e 2527_2538del12 rispettivamente determinano la stessa sostituzione di aminoacido.

[‡] Le mutazioni 2524_2535del12 e 2526_2537del12 determinano la stessa sostituzione di acido nucleico e vengono analizzate dalla stessa sequenza.

[§] La mutazione 2526_2538>G e 2524_2526GAC>TAT non può essere analizzata con la modalità AQ del software PyroMark Q24.

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

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Agenti chimici pericolosi</p> <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>Il soggetto responsabile (ad esempio, il direttore del laboratorio) deve adottare tutte le precauzioni necessarie per garantire la sicurezza del luogo di lavoro e prevenire l'esposizione degli operatori a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), così definite nelle schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) o nei documenti OSHA*, ACGIH† o COSHH‡ pertinenti.</p> <p>Lo sfianto 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 vigenti a livello nazionale, statale e locale per quanto riguarda lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

Punti importanti prima di iniziare

- Per questo protocollo è necessario procurarsi acqua altamente depurata (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com o equivalente).

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. Lavare i recipienti con acqua altamente depurata, oppure sostituirli se necessario.**

B4. Svotare il contenitore del materiale di scarto.

È possibile rimuovere il tappo senza scollegare il tubo.

B5. 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	Indice generale	N° di catalogo
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Per 24 reazioni sui sistemi PyroMark Q24: Seq Primer, PCR Primer, Unmethylated Control DNA, PyroMark PCR Master Mix, CoralLoad Concentrate, PyroMark Binding Buffer, PyroMark Annealing Buffer, PyroMark Denaturation Solution, PyroMark Wash Buffer, Enzyme Mixture, Substrate Mixture, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP e H ₂ O	971510
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
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 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 analitico	9019062

* Solo Regno Unito.

† Resto del mondo.

Prodotto	Indice generale	N° di catalogo
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
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
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

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 possono essere scaricati dal sito www.qiagen.com o richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group); Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.); Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation); FrameStar® (4fitude Ltd.); Milli-Q® (Millipore Corporation); Sepharose® (GE Healthcare); Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries); Windows® (Microsoft Corporation).

Contratto di licenza limitata per il kit *therascreen* GIST RapidScreen 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 Kit. 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 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 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.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

