


Manuale del kit *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR

Versione 1

 24

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con lo strumento Rotor-Gene[®] Q Mdx 5plex HRM

CE

REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, Regno Unito

R4 **MAT** 1063321IT



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.

Contenuto

Uso previsto	5
Riassunto e spiegazione	5
Principio della procedura	6
Materiale fornito	9
Contenuto del kit	9
Materiale necessario ma non fornito	10
Avvertenze e precauzioni	11
Informazioni di sicurezza	11
Precauzioni generali	11
Conservazione e gestione dei reagenti	12
Conservazione e gestione dei campioni	13
Procedura	13
Determinazione del livello di cellule tumorali necessario per l'analisi EGFR	13
Isolamento del DNA	14
Protocolli	
■ Valutazione del campione	15
■ Rilevazione delle mutazioni EGFR	18
■ Configurazione dello strumento Rotor-Gene Q EGFR	22
Interpretazione dei risultati	32
Analisi dei dati relativi alla valutazione del campione	32
Analisi dei dati delle mutazione EGFR	36
Guida alla risoluzione dei problemi	47
Controllo di qualità	48
Limitazioni	49
Caratteristiche prestazionali	49
Cut-off	49
Limite di sensibilità	49
Precisione	50
Riproducibilità	51
Effetto della concentrazione del DNA iniziale	51
Sostanze interferenti	52

Riferimenti bibliografici	52
Simboli	53
Indirizzi utili	53
Appendice: Dettagli delle mutazioni	54
Informazioni per gli ordini	56

Uso previsto

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è un test di diagnostica in vitro destinato alla rilevazione di 29 mutazioni somatiche nel gene tumorale EGFR e alla valutazione qualitativa dello stato mutazionale.

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR deve essere utilizzato esclusivamente da professionisti qualificati in un ambiente di laboratorio, con campioni di DNA estratti da tessuto di carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). I risultati possono aiutare il medico ad identificare i pazienti con NSCLC che potrebbero rispondere alle terapie con inibitori della tirosin-chinasi.

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è destinato all'uso nella diagnostica in vitro.

Riassunto e spiegazione

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è un prodotto pronto per l'uso, destinato alla rilevazione di 29 mutazioni somatiche nel gene tumorale EGFR tramite PCR (Polymerase Chain Reaction, reazione a catena della polimerasi) sullo strumento Rotor-Gene Q.

L'uso delle tecnologie Scorpions® e ARMS® consente al kit *therascreen* EGFR RGQ PCR di rilevare le mutazioni elencate di seguito su un fondo di DNA genomico wild-type.

- 19 delezioni nell'esone 19 (rileva la presenza di una qualunque delle 19 delezioni, ma senza discriminazione)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (rileva la presenza di G719S, G719A o G719C, ma senza discriminazione)
- S768I
- 3 inserzioni nell'esone 20 (rileva la presenza di una qualunque delle 3 inserzioni, ma senza discriminazione).

I metodi utilizzati nel kit sono altamente selettivi e, a seconda della quantità totale di DNA presente, consentono di rilevare una percentuale bassa di mutante in un fondo di DNA genomico wild-type. Questi limiti di selettività e sensibilità sono superiori, ad esempio, a quelli delle tecnologie di sequenziamento con terminatori fluorescenti.

Principio della procedura

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utilizza due tecnologie, ARMS e Scorpions, per la rilevazione delle mutazioni mediante PCR Real-time.

ARMS

La tecnologia ARMS (Amplification Refractory Mutation System, sistema di mutazioni refrattarie all'amplificazione) consente l'amplificazione specifica di alleli o mutazioni. La *Taq* DNA polimerasi (*Taq*) è efficace per distinguere tra un appaiamento corretto e un appaiamento errato all'estremità in 3' di un primer per PCR. Viene eseguita un'amplificazione selettiva di specifiche sequenze mutate, anche nei campioni in cui prevalgono le sequenze non mutate. Quando il primer è perfettamente appaiato, l'amplificazione procede con la massima efficienza. Quando la base in 3' presenta un appaiamento errato, si osserva soltanto un'amplificazione di basso livello sul fondo.

Scorpions

La tecnologia Scorpions consente di rilevare il risultato dell'amplificazione. Il termine Scorpions descrive molecole bifunzionali contenenti un primer PCR in legame covalente con una sonda. Il fluoroforo in questa sonda interagisce con un colorante quencher, anch'esso incorporato nella sonda, che riduce la fluorescenza. Quando la sonda si lega all'amplicone, durante la PCR, il fluoroforo e il quencher si separano determinando un aumento della fluorescenza nella provetta di reazione.

Formato del kit

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR include otto saggi:

- Un saggio di controllo (Ctrl)
- Sette saggi di mutazione

Tutte le miscele di reazione contengono reagenti sufficienti per rilevare i target marcati con FAM[™], più un saggio di un controllo interno marcato con HEX[™]. Il saggio di controllo interno può rilevare la presenza di inibitori che potrebbero causare risultati falsi negativi. L'amplificazione FAM può entrare in competizione con l'amplificazione del controllo interno. La finalità del controllo interno è semplicemente dimostrare che, in assenza di amplificazione FAM, questo risultato è realmente negativo e non si tratta di una reazione PCR non riuscita.

Procedura

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR prevede una procedura in due fasi. Nella prima fase viene eseguito il saggio di controllo, per valutare il contenuto totale

di DNA in un campione. Nella seconda fase vengono eseguiti sia i saggi di mutazione che il saggio di controllo, per determinare la presenza o l'assenza di DNA mutato.

Saggi:

Saggio di controllo

Il saggio di controllo, marcato con FAM, consente di valutare il contenuto totale di DNA in un campione. Questo saggio amplifica una regione dell'esone 2 del gene EGFR. Il primer e la sonda sono formulati in modo tale da evitare qualsiasi polimorfismo noto del gene EGFR.

Si raccomanda vivamente di utilizzare la miscela della reazione di controllo (Ctrl) inclusa nel kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per valutare il DNA totale in un campione. Il saggio di controllo amplifica una regione dell'esone 2 del gene EGFR. Si raccomanda di allestire i campioni solo con il saggio di controllo, utilizzando EGFR Positive Control (PC) come controllo positivo e acqua (H₂O) priva di nucleasi come controllo senza template.

Nota: la valutazione del DNA deve basarsi sulla PCR e può differire dalla quantificazione basata sulle letture dell'assorbanza. Viene fornita una miscela di reazione di controllo (Ctrl) supplementare per consentire la valutazione della qualità e quantità di DNA nei campioni prima dell'analisi con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Saggi di mutazione

Ogni saggio di mutazione contiene una sonda Scorpion marcata con FAM e un primer ARMS per la discriminazione tra il DNA wild-type e un DNA con una mutazione specifica.

Controlli

Nota: i seguenti controlli devono essere inclusi in tutte le sedute analitiche.

Controllo positivo

Per ogni seduta è necessario includere un controllo positivo nelle provette 1-8. Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contiene EGFR Positive Control (PC), da utilizzare come template nella reazione di controllo positivo. I risultati del controllo positivo verranno valutati per assicurare che il kit funzioni secondo i criteri di accettabilità dichiarati.

Controllo negativo

Per ogni seduta è necessario includere un controllo negativo (no template control, NTC) nelle provette 9-16. Il controllo NTC è costituito da acqua priva di nucleasi (H_2O), da utilizzare come “templato” per il controllo NTC. Il controllo senza templato consente di valutare sia la potenziale contaminazione durante l’allestimento della seduta, sia le prestazioni della reazione di controllo interno.

Valutazione della reazione di controllo interno

Ogni miscela di reazione contiene un controllo interno, oltre alla reazione target. Un fallimento può indicare che sono presenti inibitori in grado di indurre risultati falsi negativi o che l’operatore ha commesso un errore di allestimento della provetta interessata.

Se il fallimento del controllo interno è dovuto all’inibizione della PCR, diluendo il campione è possibile ridurre l’effetto degli inibitori, tenendo tuttavia presente che in questo modo viene diluito anche il DNA target. L’amplificazione FAM può entrare in competizione con l’amplificazione del controllo interno, cosicché il valore IC C_T (HEX) generato potrebbe non rientrare nell’intervallo specificato. I risultati FAM restano comunque validi per questi campioni.

Materiale fornito

Contenuto del kit

Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR			(24)
N° di catalogo			870111
N° di reazioni			24
Rosso	Control Reaction Mix (Miscela reazione di controllo)	Ctrl	2 x 600 µl
Viola	T790M Reaction Mix (Miscela reazione T790M)	T790M	600 µl
Arancione	Deletions Reaction Mix (Miscela reazione delezioni)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (Miscela reazione L858R)	L858R	600 µl
Verde	L861Q Reaction Mix (Miscela reazione L861Q)	L861Q	600 µl
Giallo	G719X Reaction Mix (Miscela reazione G719X)	G719X	600 µl
Grigio	S768I Reaction Mix (Miscela reazione S768I)	S768I	600 µl
Blu	Insertions Reaction Mix (Miscela reazione inserzioni)	Ins	600 µl
Marrone	EGFR Positive Control (Controllo positivo EGFR)	PC	300 µl
Turchese	Taq DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA polimerasi)	<i>Taq</i>	138 µl
Bianco	Nuclease-Free Water (Acqua priva di nuclease)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (manuale in inglese)			1

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.

- Kit di isolamento del DNA (vedere “Isolamento del DNA”, pagina 14)
- Xilene
- Etanolo (96-100%)*
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml o da 2 ml (per lisi)
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml (per eluizione) (disponibili presso Brinkmann [Safe-Lock, n° di cat. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, n° di cat. 0030 120.086] o Sarstedt [Safety Cap, n° di cat. 72.690])[†]
- Pipette dedicate[‡] (regolabili) per la preparazione dei campioni
- Pipette dedicate[‡] (regolabili) per la preparazione della soluzione Master Mix PCR
- Pipette dedicate[‡] (regolabili) per l'aliquotazione del DNA template*
- Puntali per pipette sterili prive di DNAsi, RNAsi e DNA dotate di filtri (per evitare contaminazioni crociate, è consigliabile utilizzare puntali per pipette dotati di barriere anti-aerosol)
- Thermomixer, incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, blocco riscaldante o bagnomaria in grado di sostenere un'incubazione a 90°C[‡]
- Centrifuga da tavolo[‡] con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Vortex
- Strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM[§] con canali di fluorescenza per Cycling Green e Cycling Yellow (rilevazione di FAM ed HEX, rispettivamente)
- Software Rotor-Gene Q versione 2.0.2 o superiore
- Strisce di provette e tappi da 0,1 ml, per l'uso con il rotore a 72 pozzetti (n° catalogo 981103 o 981106)

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

[†] Questo elenco di fornitori è incompleto.

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

[§] Strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM, se pertinente.
Noto in alcuni Paesi anche come Rotor-Gene Q MDx.

- Provette per microcentrifuga prive di DNAsi, RNAsi e DNA per la preparazione di miscele Master Mix
- Blocco di caricamento provette (72 x 0,1 ml); blocco in alluminio per l'allestimento manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo (QIAGEN, n° cat. 9018901)

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 sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

Informazioni di emergenza 24 ore su 24

Assistenza in caso di emergenza chimica o incidente disponibile 24 ore al giorno da:

CHEMTREC

USA e Canada ■ Tel: 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada ■ Tel: +1-703-527-3887 (chiamate a carico accettate)

Precauzioni generali

L'utente deve prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni.

- Utilizzare puntali per pipette sterili privi di DNAsi, RNAsi e DNA e dotati di filtro; assicurarsi che le pipette siano state calibrate nel rispetto delle istruzioni fornite dal produttore.
- Conservare ed estrarre il materiale positivo (campioni e controlli positivi) 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 aver scongelato i componenti, miscelarli capovolgendo ogni provetta per 10 volte e centrifugare brevemente.

Nota: agire con la massima cautela, in modo da prevenire la contaminazione delle reazioni PCR con il materiale di controllo sintetico. Si raccomanda l'uso di pipette dedicate separate per l'allestimento delle miscele di reazione e l'aggiunta del DNA template. La preparazione e l'aliquotazione delle miscele di reazione devono essere eseguite in un'area del laboratorio separata dall'area in cui avviene l'aggiunta del template. Non aprire le provette Rotor-Gene Q dopo che la seduta PCR è terminata. In questo modo è possibile prevenire la contaminazione del laboratorio con i prodotti post-PCR.

Nota: i reagenti sono validati per l'allestimento manuale. Se si utilizza un metodo automatizzato, il numero di possibili reazioni potrebbe ridursi a causa del reagente necessario per riempire i "volumi morti" su tali strumenti.

Nota: tutti i reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono formulati in modo specifico per l'uso con i test indicati. Tutti i reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti nel medesimo kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Se si desidera mantenere un livello di prestazioni ottimale, non sostituire nessuno dei reagenti del kit.

Nota: utilizzare soltanto la Taq DNA polimerasi (Taq) inclusa nel kit. Non sostituirla con Taq DNA polimerasi di altri kit dello stesso tipo o di qualsiasi altro tipo o con Taq DNA polimerasi di altri fornitori.

Nota: i reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono diluiti in percentuali ottimali. L'ulteriore diluizione dei reagenti è sconsigliata, in quanto potrebbe provocare una perdita di prestazioni. L'uso di un volume di reazione inferiore a 25 µl è sconsigliato, in quanto potrebbe aumentare il rischio di falsi negativi.

Conservazione e gestione dei reagenti

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR viene spedito in ghiaccio secco e deve essere ancora congelato alla consegna. Se il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR non dovesse essere congelato alla consegna, o se la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il tragitto, o se la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento, il manuale o i reagenti, contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Alla consegna riporre immediatamente il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR in un congelatore termoregolato e conservarlo tra -15°C e -25°C al riparo dalla luce. Il kit resta stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, se conservato alle condizioni consigliate e nella confezione originale. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente. Si raccomanda di non superare 7 cicli di congelamento-scongelamento.

Nota: per garantire funzionamento e prestazioni ottimali, i primer Scorpion (come tutte le molecole marcate con fluorescenza) devono essere protetti dalla luce per prevenirne il fotodecadimento.

Nota: per un uso ottimale dei reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è opportuno raggruppare i campioni in batch. Se i campioni vengono analizzati individualmente, aumenta il consumo di reagenti e diminuisce il numero di campioni che possono essere analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Conservazione e gestione dei campioni

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

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

I campioni tumorali non sono omogenei e i dati ottenuti da un campione di tumore potrebbero non concordare con i dati ottenuti da altre sezioni dello stesso tumore. I campioni tumorali possono inoltre contenere tessuto non tumorale. Presumibilmente, il DNA di tessuto non tumorale non dovrebbe contenere le mutazioni EGFR rilevate dal kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Procedura

Determinazione del livello di cellule tumorali necessario per l'analisi EGFR

Per le analisi EGFR viene utilizzato tessuto di carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Il DNA estratto dalle cellule con questo tessuto tumorale può essere wild-type rispetto alle mutazioni EGFR o può presentare una o più mutazioni.

Il tessuto FFPE di NSCLC utilizzato per l'estrazione può anche contenere normale tessuto non tumorale, che sarà wild-type rispetto alle mutazioni EGFR. Il DNA wild-type di questo tessuto può diluire il DNA mutante, potenzialmente fino a un livello tale da renderlo non più rilevabile dal kit. Si raccomanda tuttavia di analizzare anche i campioni con livelli tumorali bassi, in quanto potenzialmente potrebbero essere rilevate mutazioni di alto livello e formulate decisioni terapeutiche adeguate per il paziente.

Per aumentare al massimo le probabilità di rilevare le mutazioni, procedere nel modo seguente.

- È colorato con ematossilina ed eosina (H&E) almeno un vetrino di ogni campione del paziente.
- Assicurarsi che un patologo esamini il vetrino colorato per confermare la presenza del tumore.

- Se possibile, il patologo dovrebbe esaminare vari vetrini di tutto il blocco FFPE.
- Tutti i campioni in cui è presente il tumore possono essere analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Isolamento del DNA

L'isolamento del DNA deve essere eseguito con QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.

Eeguire la purificazione del DNA seguendo le istruzioni del manuale QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*), con le modifiche seguenti.

- Raccogliere le sezioni FFPE su vetrini di vetro.
- Raschiare via la paraffina in eccesso attorno alle sezioni tissutali, utilizzando uno scalpello nuovo e sterile.
- Raschiare le sezioni tissutali e raccoglierle nelle provette per microcentrifuga, utilizzando uno scalpello nuovo per ogni campione da estrarre.
- La digestione con proteinasi K deve durare 1 ora.
- Il DNA genomico purificato deve essere eluito in 200 µl di tampone ATE (fornito in QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
- Conservare il DNA genomico purificato tra –15°C e –30°C.
- Dove sono disponibili informazioni, dovrebbero essere utilizzati i vetrini adiacenti al vetrino colorato con H&E con il maggior contenuto tumorale.

Nota: tutti i saggi inclusi nel kit *therascreen* EGFR RGQ PCR generano prodotti della PCR corti. Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR non funzionerà tuttavia con DNA fortemente frammentato.

Protocollo: Valutazione del campione

Questo protocollo consente di valutare la quantità totale di DNA amplificabile nei campioni.

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di iniziare la procedura, leggere “Precauzioni generali”, a pagina 11.
- Acquisire esperienza con l’uso dello strumento Rotor-Gene Q prima di iniziare il protocollo. Consultare il manuale utente dello strumento.
- Non agitare in vortex la *Taq* DNA polimerasi (*Taq*) o qualsiasi miscela contenente *Taq* DNA polimerasi (*Taq*), in quanto l’enzima potrebbe diventare inattivo.
- Pipettare la *Taq* DNA polimerasi (*Taq*) inserendo il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, per evitare che il puntale si cosparga eccessivamente di enzima.

Prima di iniziare

- Prima di ogni uso, è necessario scongelare completamente tutti i reagenti a temperatura ambiente (15–25°C), miscelare capovolgendo ogni provetta 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta.
- Prima dell’uso, lasciare che la *Taq* DNA polimerasi (*Taq*) raggiunga la temperatura ambiente (15–25°C). Centrifugare brevemente la provetta affinché l’enzima si depositi sul fondo.

Procedura

1. **Scongelare la miscela della reazione di controllo (Ctrl), l’acqua priva di nucleasi per il controllo senza template (NTC) e il controllo positivo EGFR (PC) a temperatura ambiente (15–25°C). Quando i reagenti si saranno scongelati, miscelarli capovolgendo ogni provetta 10 volte per prevenire concentrazioni localizzate di sali, quindi centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo.**
2. **Preparare una quantità di Master Mix sufficiente per i campioni di DNA, una reazione di controllo positivo e una reazione di controllo senza template, rispettando i volumi indicati in Tabella 1. Includere i reagenti per 1 campione extra, in modo da fornire una quantità più che sufficiente per l’allestimento PCR.**

La miscela Master Mix contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Tabella 1. Preparazione della miscela Master Mix per il saggio di controllo*

Componente	Volume/reazione (μl)
Miscela reazione di controllo (Ctrl)	19,5
<i>Taq</i> DNA polimerasi (<i>Taq</i>)	0,5
Volume totale	20,0

* Durante la preparazione della miscela Master Mix, preparare una quantità sufficiente per un campione in più.

- Miscelare con cura la miscela Master Mix pipettando su e giù per 10 volte delicatamente. Aggiungere immediatamente 20 μl di Master Mix in ogni striscia di provette per PCR (non fornite).**

Nota: per la valutazione del campione, la miscela Master Mix di controllo dovrebbe essere aggiunta in un pozzetto con il controllo positivo, un pozzetto con il controllo negativo e un pozzetto per ogni campione.

- Aggiungere immediatamente 5 μl di acqua priva di nucleasi (H₂O) nella provetta del controllo senza template (provetta per PCR numero 9), quindi tappare. Aggiungere 5 μl di DNA campione nelle provette campione, quindi tappare. Aggiungere 5 μl di controllo positivo (PC) EGFR nella provetta del controllo positivo (provetta PCR 1), quindi tappare.**
- Inserire le strisce di provette per PCR nelle posizioni appropriate sul rotore, quindi verificare visivamente che tutte le provette contengano un volume uguale.**
Nota: assicurarsi che le strisce di provette non vengano invertite durante il trasferimento sul rotore.
- Se il rotore non è pieno, riempire gli spazi liberi con provette vuote tappate.**
- Caricare immediatamente il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Assicurarsi che l'anello bloccante (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia montato esattamente sopra al rotore, in modo che le provette restino ferme durante la seduta.**
- Fare riferimento alle istruzioni per la configurazione dello strumento Rotor-Gene Q (vedere "Protocollo: Configurazione dello strumento Rotor-Gene Q EGFR", a pagina 22) per creare il profilo delle temperature e avviare la seduta.**

Tabella 2. Parametri di ciclaggio

Cicli	Temperatura	Durata	Acquisizione di dati
1	95°C	15 minuti	Nessuno
40	95°C	30 secondi	Nessuno
	60°C	60 secondi	Verde e giallo

- 9. Al termine della seduta, analizzare i dati in base alle indicazioni contenute nella sezione “Analisi dei dati relativi alla valutazione del campione”, a pagina 32.**

Protocollo: Rilevazione delle mutazioni EGFR

Questo protocollo consente di rilevare le mutazioni EGFR. Se un campione ha superato la valutazione, può essere analizzato con i saggi per le mutazioni EGFR.

Punti importanti prima di iniziare

- Prima di iniziare la procedura, leggere “Precauzioni generali”, a pagina 11.
- Acquisire esperienza con l’uso dello strumento Rotor-Gene Q prima di iniziare il protocollo. Consultare il manuale utente dello strumento.
- Non agitare in vortex la *Taq* DNA polimerasi (*Taq*) o qualsiasi miscela contenente *Taq* DNA polimerasi, in quanto l’enzima potrebbe diventare inattivo.
- Per un uso efficiente del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è necessario raggruppare i campioni in batch di 7, così da poter riempire il rotore a 72 pozzetti. Utilizzando batch più piccoli, si ridurrà il numero di campioni che è possibile analizzare con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Pipettare la *Taq* inserendo il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, evitando che il puntale si cosparga eccessivamente di enzima.
- Per ogni campione di DNA, è necessario analizzare i saggi di controllo e di mutazione nella stessa seduta PCR, così da evitare eventuali variazioni tra le sedute.

Prima di iniziare

- Prima di ogni uso, è necessario scongelare completamente tutti i reagenti a temperatura ambiente (15–25°C), miscelare capovolgendo ogni provetta 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta.
- Prima di ogni uso, assicurarsi che la *Taq* abbia raggiunto la temperatura ambiente (15–25°C). Centrifugare brevemente la provetta affinché l’enzima si depositi sul fondo.

Procedura

- 1. Scongelare le miscele di reazione, l’acqua priva di nucleasi per il controllo senza template (NTC) e il controllo positivo (PC) EGFR a temperatura ambiente (15–25°C). Quando i reagenti si saranno scongelati, miscelarli capovolgendo ogni provetta 10 volte per**

prevenire concentrazioni localizzate di sali, quindi centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo.

2. Preparare una quantità di Master Mix sufficiente per i campioni di DNA, una reazione di controllo positivo e una reazione di controllo senza template, rispettando i volumi indicati in Tabella 3. Includere i reagenti per 1 campione extra, in modo da fornire una quantità più che sufficiente per l'allestimento PCR.

La miscela Master Mix contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Tabella 3. Preparazione delle miscele Master Mix*

Componente	Volume/reazione (µl)
Miscela di reazione	19,5
Taq DNA polimerasi (Taq)	0,5
Volume totale	20,0

* Durante la preparazione della miscela Master Mix, preparare una quantità sufficiente per un campione in più.

3. Miscelare con cura ogni miscela Master Mix pipettando su e giù per 10 volte delicatamente. Aggiungere immediatamente 20 µl di miscela Master Mix a ogni striscia di provette per PCR (non fornite).
4. Aggiungere immediatamente 5 µl di acqua priva di nucleasi (H₂O) nella striscia di provette per PCR del controllo senza template (provette per PCR 9–16), quindi tappare le provette. Aggiungere 5 µl di ogni campione nelle provette campione (provette per PCR 17–72), quindi tappare. Aggiungere 5 µl di controllo positivo (PC) EGFR nelle provette del controllo positivo (provette per PCR 1–8). Ogni campione di DNA deve essere analizzato sia con il saggio di controllo, sia con tutti i saggi di mutazione. La disposizione è illustrata nella Tabella 4.

Tabella 4. Disposizione dei saggi di controllo e di mutazione

Saggio	Controlli		Numero del campione						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Delezioni	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Inserzioni	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- 5. Inserire le strisce di provette per PCR nelle posizioni appropriate sul rotore, quindi verificare visivamente che tutte le provette contengano un volume uguale.**

Nota: assicurarsi che le strisce di provette non vengano invertite durante il trasferimento sul rotore.

- 6. Se il rotore non è pieno, riempire gli spazi liberi con provette vuote tappate.**
- 7. Caricare immediatamente il rotore sullo strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Assicurarsi che l'anello bloccante (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q) sia montato esattamente sopra al rotore, in modo che le provette restino ferme durante la seduta.**
- 8. Fare riferimento alle istruzioni per la configurazione dello strumento Rotor-Gene Q (vedere "Protocollo: Configurazione dello strumento Rotor-Gene Q EGFR", a pagina 22) per creare il profilo delle temperature e avviare la seduta.**

Tabella 5. Parametri di ciclaggio

Cicli	Temperatura	Durata	Acquisizione di dati
1	95°C	15 minuti	Nessuno
40	95°C	30 secondi	Nessuno
	60°C	60 secondi	Verde e giallo

9. Al termine della seduta, analizzare i dati in base alle indicazioni contenute nella sezione “Analisi dei dati delle mutazione EGFR”, a pagina 36.■

Protocollo: Configurazione dello strumento Rotor-Gene Q EGFR

È possibile trovare riferimenti a questo protocollo nelle sezioni "Protocollo: Valutazione del campione", pagina 15, e "Protocollo: Rilevazione delle mutazioni EGFR", pagina 18.

Procedura

1. Creare un profilo delle temperature rispettando i passaggi seguenti.

Impostazione dei parametri generali del saggio	Figure 1–3
Attivazione iniziale dell'enzima hot-start	Figura 4
Amplificazione del DNA	Figure 5–7
Regolazione dei canali di fluorescenza	Figure 8–12
Avvio della seduta	Figura 13

In sintesi, i parametri di ciclaggio sono i seguenti.

Tabella 6. Parametri di ciclaggio

Cicli	Temperatura	Durata	Acquisizione di dati
1	95°C	15 minuti	Nessuno
40	95°C	30 secondi	Nessuno
	60°C	60 secondi	Verde e giallo

Tutte le specifiche tecniche si riferiscono al software Rotor-Gene Q versione 2.0.2. Per ulteriori informazioni sulla programmazione degli strumenti Rotor-Gene, consultare il manuale utente dello strumento specifico. Nelle illustrazioni, le impostazioni descritte sono evidenziate in neretto all'interno di una cornice.

2. Fare doppio clic sull'icona del software Rotor-Gene Q, versione 2.0.2, sul desktop del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM. Selezionare la scheda "Advanced" (Avanzate) nella finestra "New Run" (Nuova seduta) che viene visualizzata.

3. Per creare un nuovo modello selezionare “Empty Run” (Seduta vuota), quindi fare clic su “New” (Nuova) per avviare “New Run Wizard” (Creazione guidata nuova seduta).
4. Selezionare *72-Well Rotor* (Rotore a 72 pozzetti) come tipo di rotore. Confermare che l’anello bloccante è montato e selezionare la casella “Locking Ring Attached” (Anello bloccante collegato). Fare clic su “Next” (Avanti) (Figura 1).

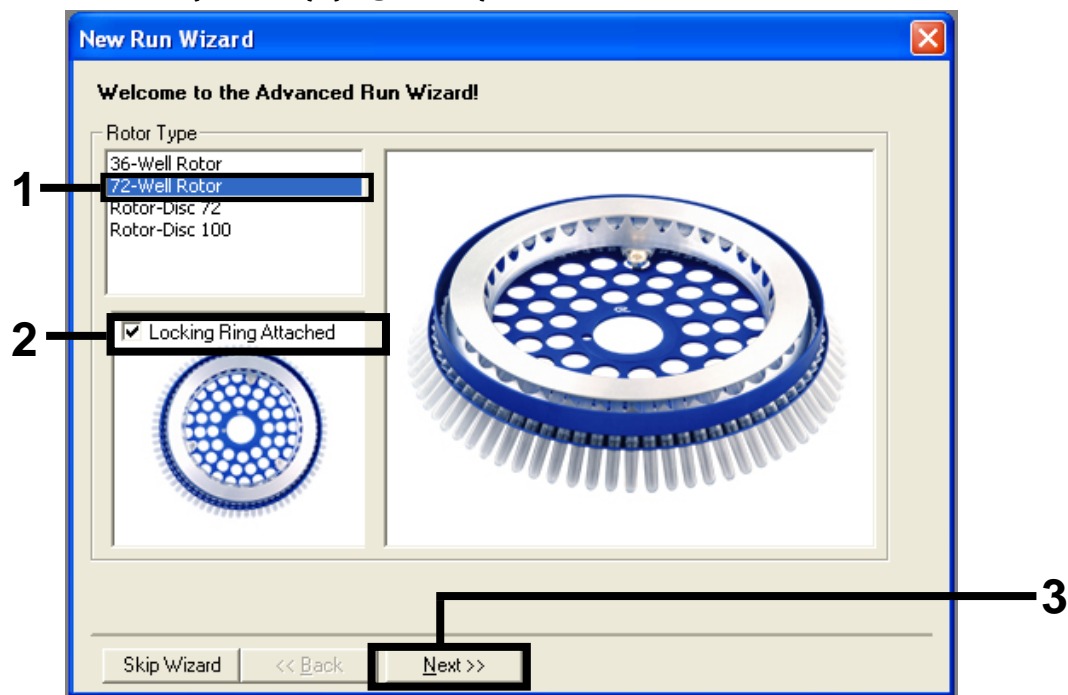


Figura 1. Finestra di dialogo “New Run Wizard” (Creazione guidata nuova seduta).

5. Immettere il nome dell'operatore. Aggiungere eventuali note e immettere 25 come volume della reazione. Assicurarsi che nella casella "Sample Layout" (Configurazione campioni) sia indicato "1, 2, 3...". Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 2).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It contains the following fields and controls:

- Operator :** A text box containing 'QIAGEN', highlighted with a black box and labeled with a '1'.
- Notes :** A large text area, highlighted with a black box and labeled with a '2'.
- Reaction Volume (μL):** A numeric spinner box set to '25', highlighted with a black box and labeled with a '3'.
- Sample Layout :** A dropdown menu showing '1, 2, 3...', highlighted with a black box and labeled with a '4'.
- Buttons:** 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. The 'Next >>' button is highlighted with a black box.
- Help:** A yellow box on the right with text explaining the help system.

Figura 2. Impostazione dei parametri generali del saggio.

6. Fare clic sul pulsante “Edit Profile” (Modifica profilo) nella finestra di dialogo successiva in “New Run Wizard” (Creazione guidata nuova seduta) (Figura 3), quindi programmare il profilo delle temperature in base alle informazioni fornite nei passaggi seguenti.

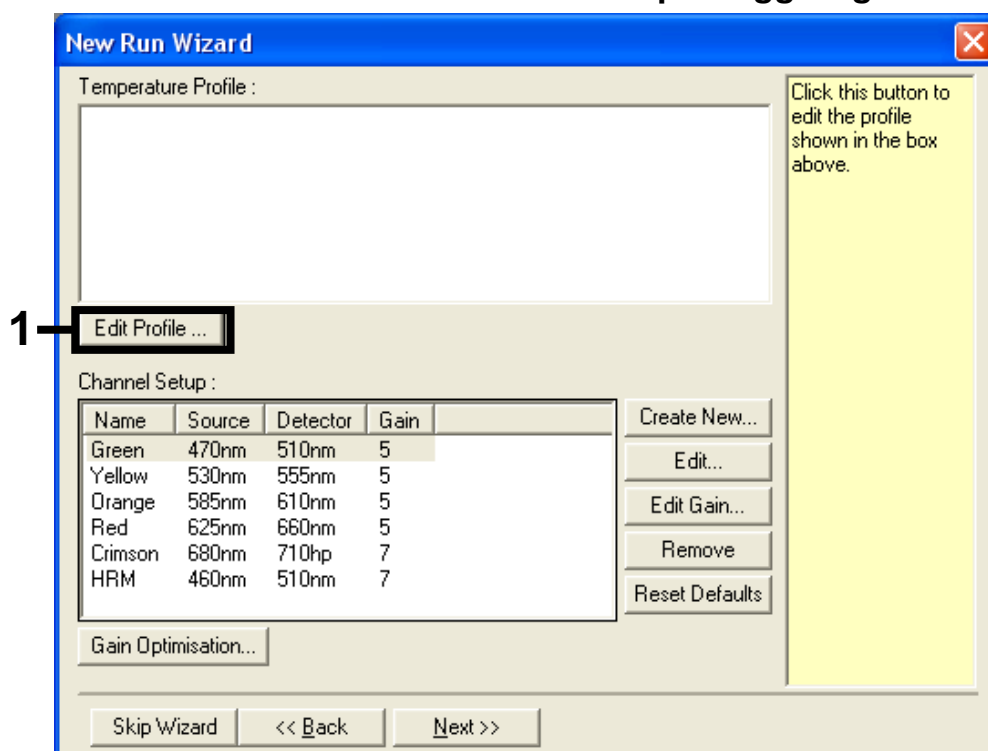


Figura 3. Modifica del profilo.

7. Fare clic sul pulsante “Insert after” (Inserisci dopo), quindi selezionare *New Hold at Temperature* (Nuova sospensione alla temperatura) (Figura 4).

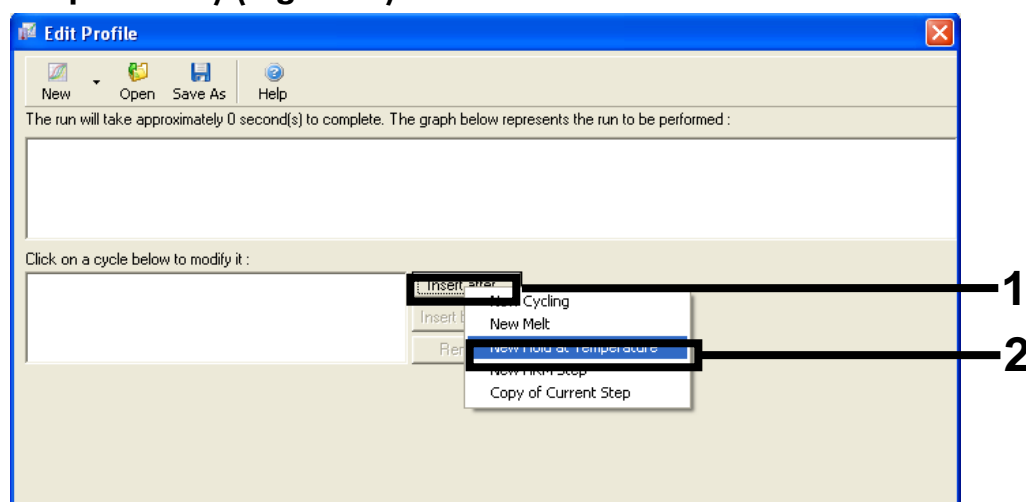


Figura 4. Fase di incubazione iniziale a 95°C.

8. Impostare 95°C per “Hold Temperature” (Temperatura di sospensione) e 15 minuti per “Hold Time” (Durata sospensione). Fare clic sul pulsante “Insert after” (Inserisci dopo), quindi selezionare “New Cycling” (Nuovo ciclaggio) (Figura 5).

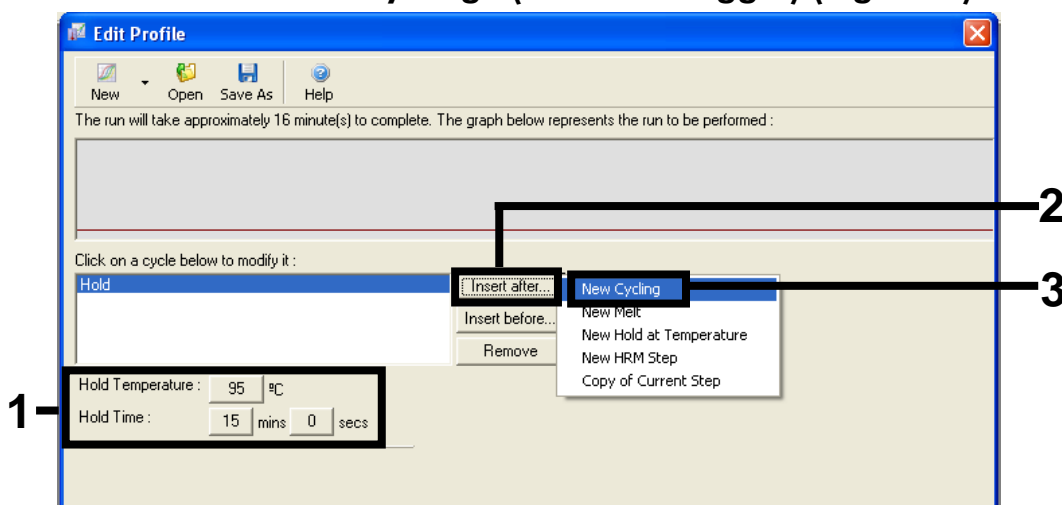


Figura 5. Fase di incubazione iniziale a 95°C.

9. Impostare 40 come numero di ripetizioni del ciclo. Selezionare il primo passaggio e impostare 95°C for 30 secs (95°C per 30 secondi) (Figura 6).

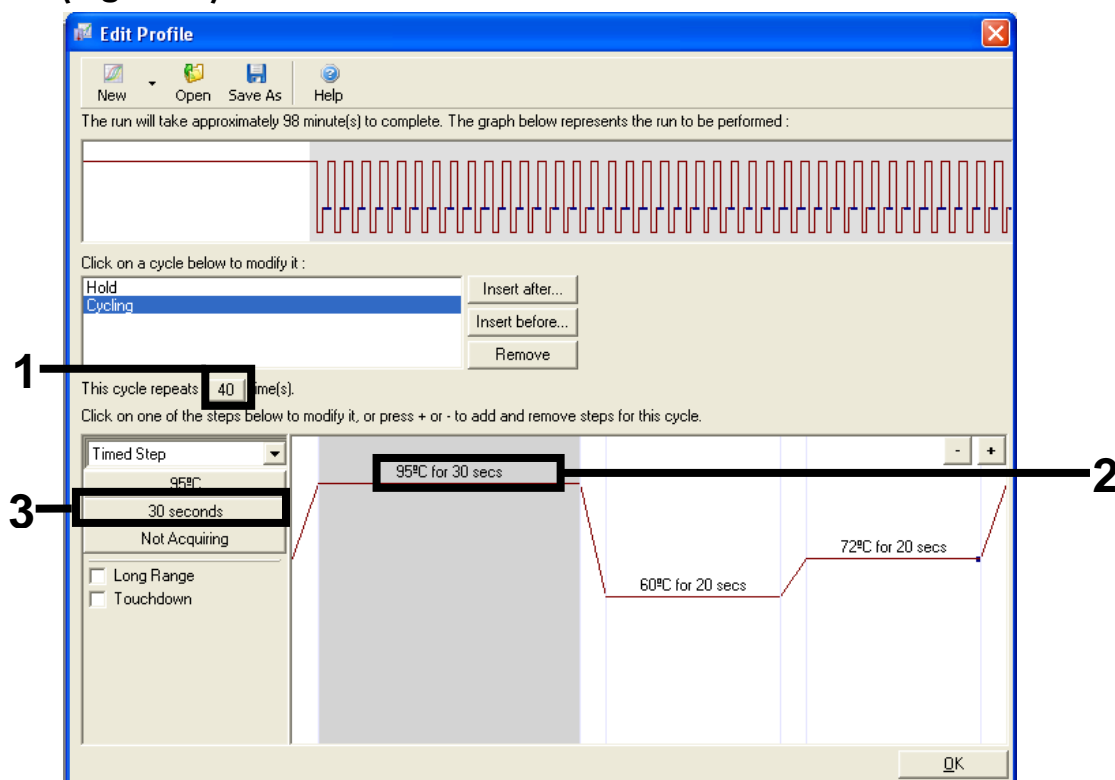


Figura 6. Fase di ciclaggio a 95°C.

10. Evidenziare il secondo passaggio e impostare 60°C for 60 secs (60°C per 60 secondi). Abilitare l'acquisizione di dati in questo passaggio,

selezionando il pulsante “Not Acquiring” (No acquisizione) (Figura 7).

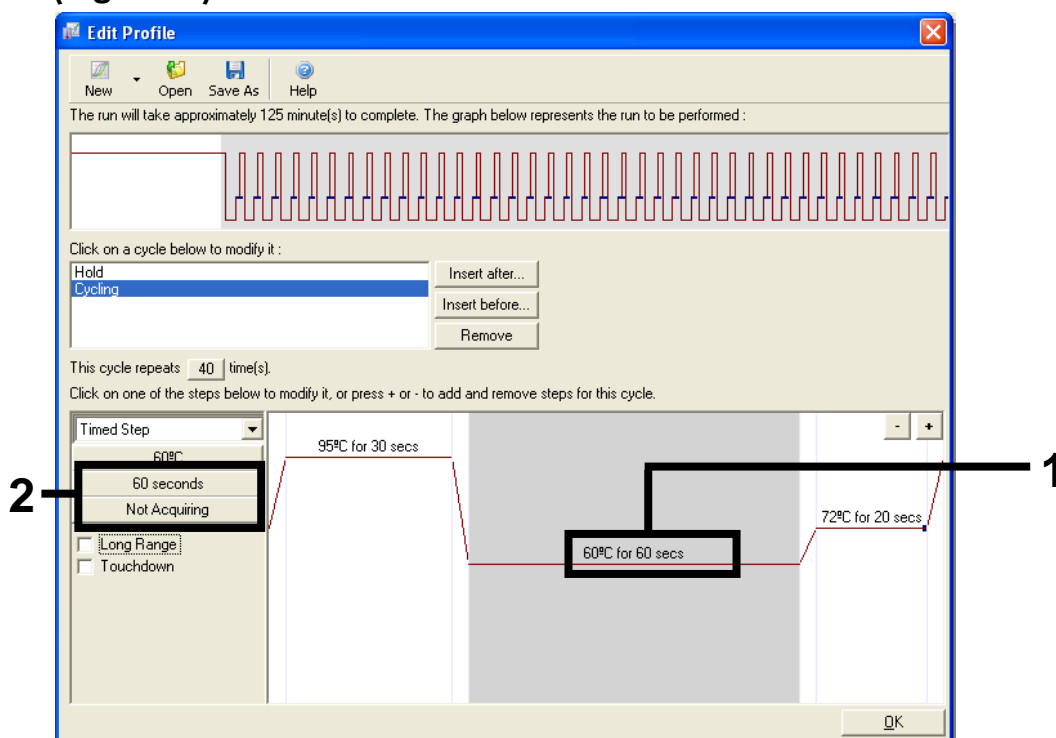


Figura 7. Fase di ciclaggio a 60°C.

11. Impostare i canali di acquisizione Green e Yellow (Verde e Giallo) selezionando il pulsante “>” per spostare questi elementi nell’elenco “Available Channels” (Canali disponibili). Fare clic su “OK” (Figura 8).

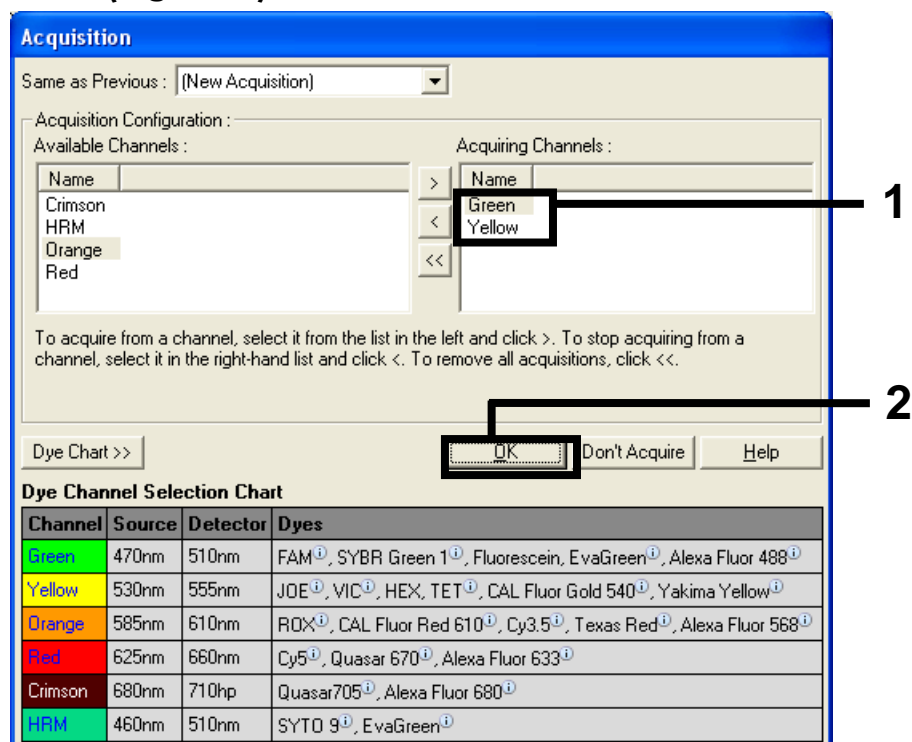


Figura 8. Acquisizione durante la fase di ciclaggio a 60°C.

12. Evidenziare il terzo passaggio e cancellare facendo clic sul pulsante "-". Fare clic su "OK" (Figura 9).

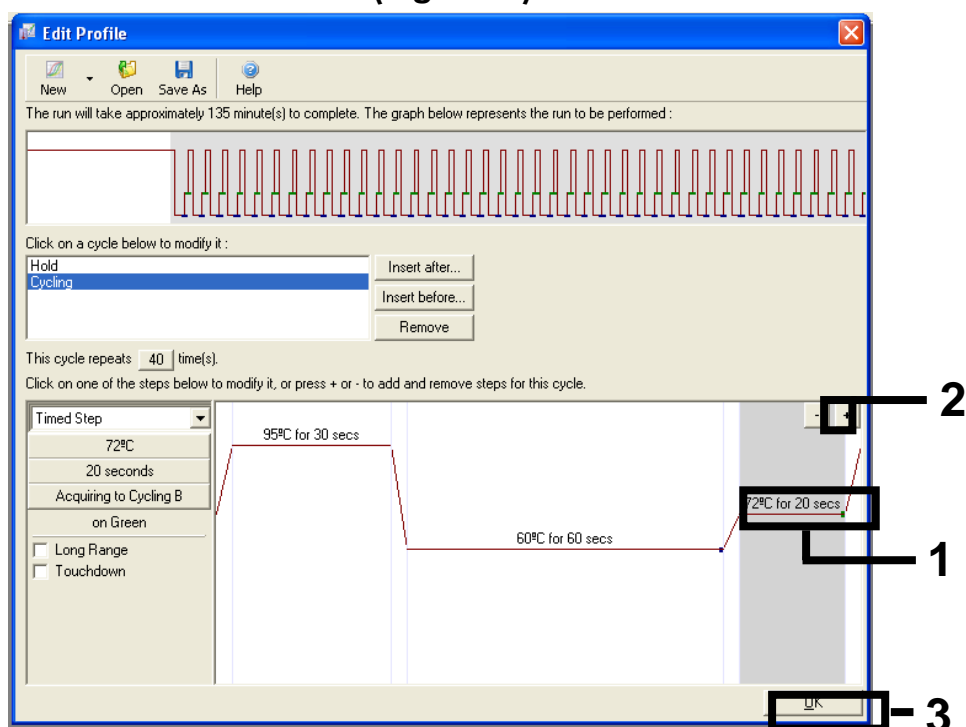


Figura 9. Rimozione della fase di estensione.

13. Nella finestra di dialogo successiva fare clic sul pulsante "Gain Optimisation" (Ottimizzazione del guadagno) (Figura 10).

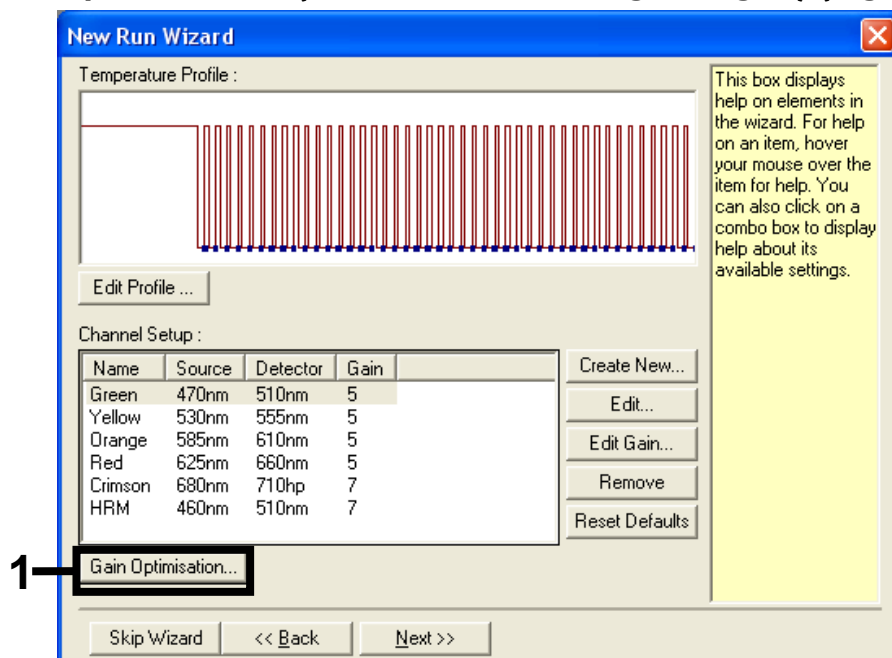


Figura 10. Ottimizzazione del guadagno.

14. Fare clic sul pulsante “Optimise Acquiring” (Ottimizza acquisizione). Vengono visualizzate le impostazioni per ogni canale. Accettare i valori predefiniti facendo clic su “OK” per entrambi i canali (Figura 11).

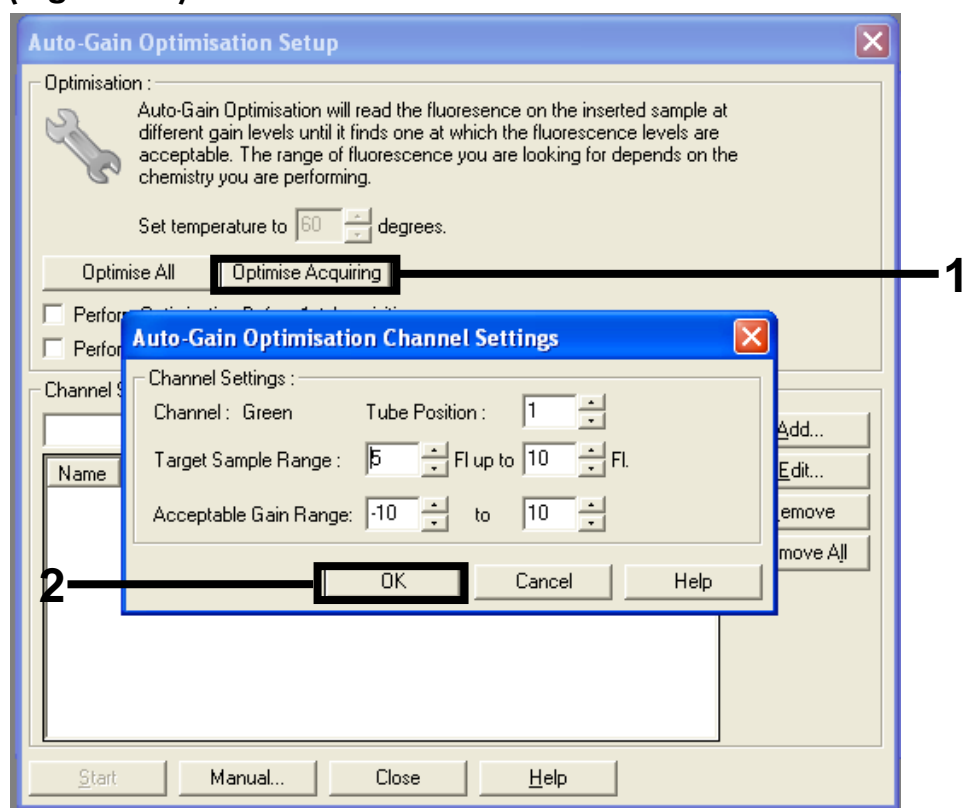


Figura 11. Ottimizzazione automatica del guadagno per il canale verde.

15. Selezionare la casella “Perform Optimisation before 1st Acquisition” (Esegui acquisizione prima della 1a acquisizione), quindi fare clic sul pulsante “Close” (Chiudi) per tornare alla creazione guidata (Figura 12).

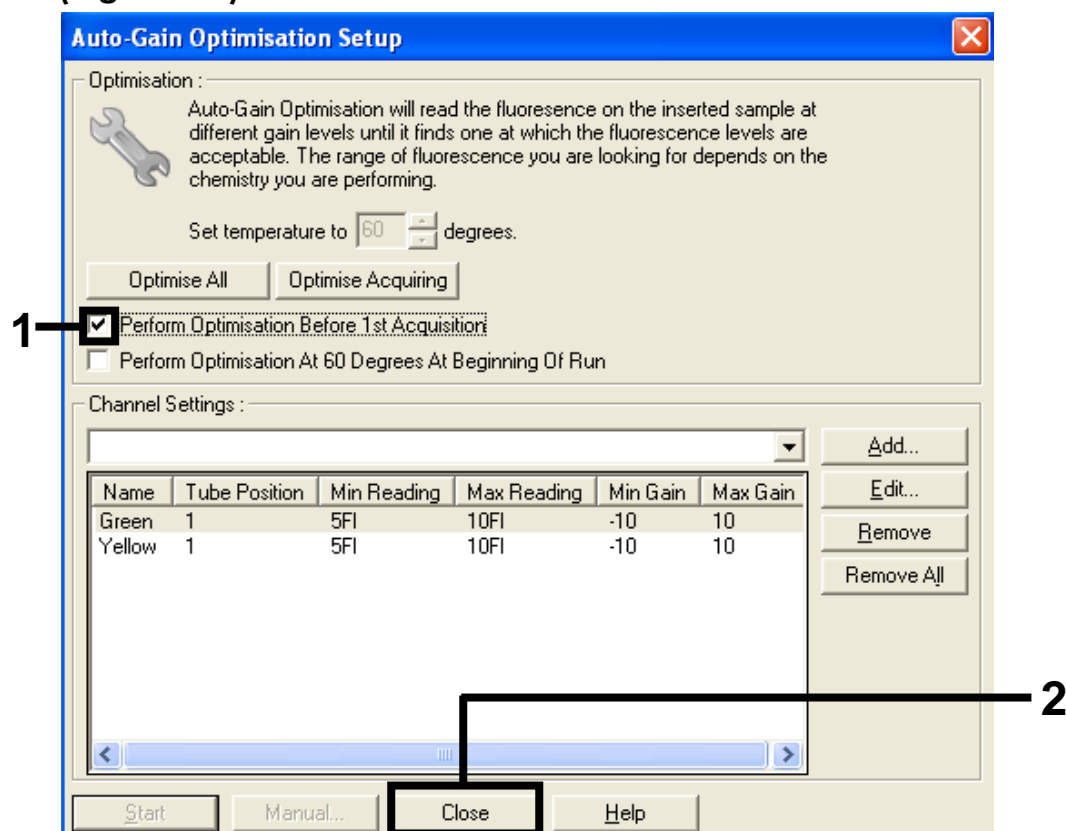


Figura 12. Selezione dei canali verde e giallo.

16. Fare clic su “Next” (Avanti) e salvare il modello in un percorso appropriato, selezionando “Save Template” (Salva modello).

- 17. Controllare il riepilogo e fare clic su “Start Run” (Avvia seduta) per salvare il file della seduta e avviare la seduta (Figura 13).**

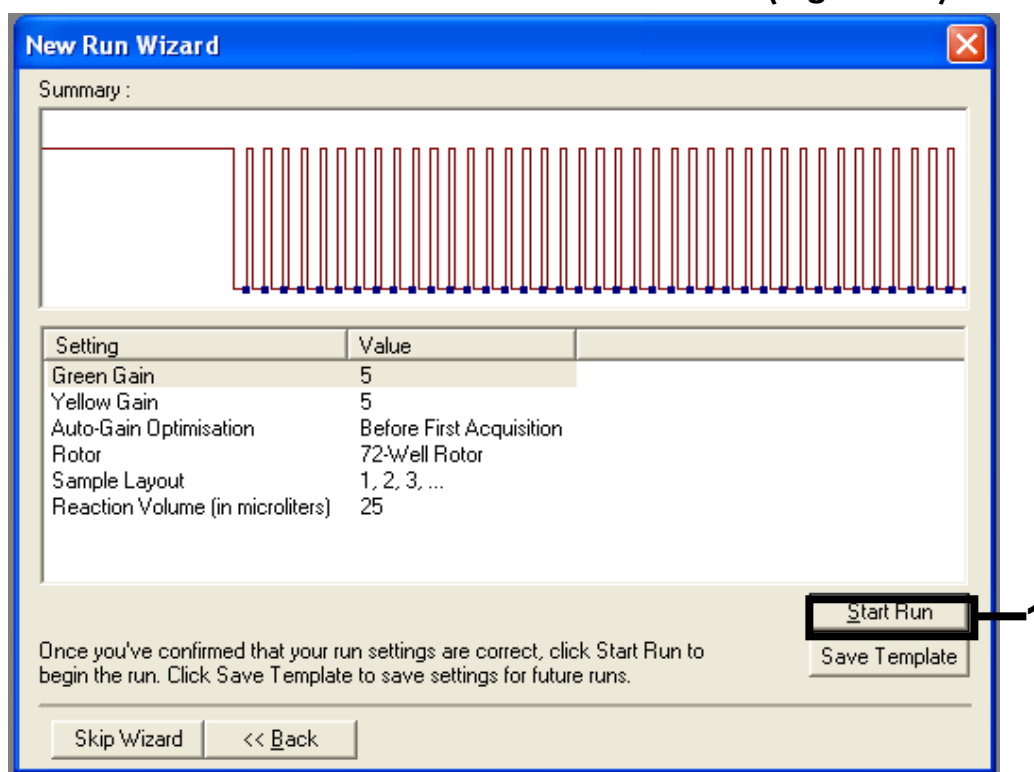


Figura 13. Avvio della seduta.

- 18. Dopo l’avvio della seduta viene visualizzata una nuova finestra, nella quale è possibile immettere i nomi dei campioni subito oppure, facendo clic su “Finish” (Fine), immettere i nomi in seguito, selezionando il pulsante “Sample” (Campione) durante o al termine della seduta.**
- 19. Al termine della seduta, analizzare i dati facendo riferimento al protocollo appropriato:**
- Per la valutazione del campione, vedere “Analisi dei dati relativi alla valutazione del campione”, pagina 32.
 - Per l’analisi delle mutazioni, vedere “Analisi dei dati delle mutazione EGFR”, pagina 36.

Interpretazione dei risultati

Metodo analitico ΔC_T

Nei saggi Real-time Scorpions, il numero di cicli di PCR necessari per rilevare un segnale fluorescente al di sopra del segnale di fondo è il parametro con cui vengono misurate le molecole target presenti all'inizio della reazione. Il punto in cui il segnale viene rilevato al di sopra della fluorescenza di fondo è detto "ciclo soglia" (Cycle Threshold, C_T).

I valori ΔC_T del campione vengono calcolati come differenza tra C_T del saggio di mutazione e C_T del saggio di controllo per lo stesso campione.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutazione} - C_T \text{ controllo}$$

Nota: i campioni sono classificati come positivi alla mutazione se restituiscono un valore ΔC_T inferiore al valore ΔC_T di cut-off per il saggio. Al di sopra di questo valore, il campione potrebbe contenere una mutazione in una percentuale inferiore a quella rilevabile dal kit (oltre il limite di sensibilità dei saggi) o potrebbe essere negativo alla mutazione.

Nota: valori C_T della mutazione maggiori o uguali a 40 verranno classificati come negativi o oltre i limiti di sensibilità del kit.

Quando si utilizzano i primer ARMS, potrebbe verificarsi un innesco inefficiente con un conseguente ritardo molto significativo nella rilevazione del C_T di fondo da DNA privo di mutazioni. Tutti i valori ΔC_T calcolati dall'amplificazione di fondo saranno maggiori dei valori ΔC_T di cut-off e il campione verrà classificato come negativo alla mutazione.

Analisi dei dati relativi alla valutazione del campione

Al termine della seduta, è possibile analizzare i dati in base alla procedura seguente.

Impostazioni del software relative all'analisi

1. **Aprire il file appropriato utilizzando il software Rotor-Gene Q, versione 2.0.2 o successiva.**
2. **Verificare che i campioni siano marcati.**
3. **Dopo aver visualizzato la pagina del canale dei dati grezzi per ogni rilevatore/canale, fare clic su "Options" (Opzioni) e immettere Crop start cycles (Taglia cicli di avvio). Nella pagina con "Remove data before cycle" (Rimuovi dati prima del ciclo), immettere 15 e fare clic su "OK".**
4. **Fare clic su "Analysis" (Analisi). Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclaggio A (da 15), Giallo) per controllare il canale HEX.**

5. Assicurarsi che l'opzione "dynamic tube" (provetta dinamica) sia evidenziata. Fare clic su "Slope correct" (Slope corretto) e "Linear scale" (Scala lineare).
6. Impostare 0.02 per la soglia e controllare i valori C_T HEX.
7. Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A (from 15), Green" (Ciclaggio A (da 15), Verde) per visualizzare il canale FAM.
8. La provetta dinamica dovrebbe essere evidenziata. Fare clic su "Slope correct" (Slope corretto) e "Linear scale" (Scala lineare).
9. Impostare 0.075 per la soglia e controllare i valori C_T FAM.

Al termine della seduta, analizzare i dati nel modo seguente.

- **Controllo negativo:** per confermare l'assenza di contaminazione del template, il controllo NTC non deve generare un valore C_T inferiore a 40 nel canale verde (FAM). Per informazioni importanti sull'analisi dei grafici dei controlli NTC, vedere "Note per l'interpretazione dei dati" a pagina 42. Per essere certi che la seduta sia stata impostata correttamente, il controllo NTC deve presentare un'amplificazione di 31–37 nel canale giallo (HEX).
Se c'è amplificazione positiva nel canale verde e/o amplificazione al di fuori dell'intervallo 31–37 nel segnale giallo, i risultati del campione devono essere scartati.
- **Controllo positivo:** il controllo positivo (PC) EGFR deve generare un valore C_T del saggio di controllo (canale FAM) compreso tra 26,26 e 30,95. Una seduta con un valore C_T che non rientra in questo intervallo di valori indica un problema di allestimento del saggio, pertanto la seduta non può essere considerata valida. Se il valore C_T del saggio di controllo positivo è compreso tra 26,26 e 30,95 (esone 2, FAM), ma il valore C_T del controllo interno (HEX) non rientra nell'intervallo 31–37, andare avanti con l'analisi.

Nota: se uno di questi due controlli della seduta fallisce, i dati dei campioni non devono essere utilizzati.

Posto che entrambi i controlli della seduta siano validi, ogni valore C_T del campione deve essere obbligatoriamente compreso tra 23 e 30,69 nel canale verde (FAM). Se il campione non rientra in questo intervallo di valori, attenersi alle indicazioni seguenti.

- **Valore C_T del saggio di controllo del campione < 23:** i campioni con un valore C_T di controllo <23 determineranno un sovraccarico per i saggi di mutazione, pertanto devono essere diluiti. Per rilevare ogni mutazione a un livello basso, i campioni troppo concentrati devono essere diluiti in modo da rientrare nell'intervallo di valori indicato, tenendo presente che diluendo della metà si aumenterà il C_T di 1.

- **C_T del saggio di controllo del campione tra 30,69 e 37:** interpretare i dati con cautela, poiché le mutazioni di livello molto basso potrebbero non essere rilevate.
- **C_T del saggio di controllo del campione tra 37 e 40:** interpretare i dati con cautela, poiché verranno rilevate solo le mutazioni di livello molto alto.
- **Valore C_T saggio di controllo campione >40:** il campione non contiene una quantità di DNA sufficiente per l'analisi.

Nota: se un campione non genera un valore C_T (cioè, $C_T > 40$), la causa potrebbe essere la presenza di un inibitore, un errore nell'allestimento del saggio o l'assenza di DNA di EGFR amplificabile.

- **Valore C_T saggio di controllo interno tra 31 e 37:** non è presente DNA di EGFR amplificabile.
- **C_T del saggio di controllo interno fuori dall'intervallo 31-37:** potrebbe indicare un errore di allestimento del saggio o la presenza di un inibitore. È possibile attenuare l'effetto di un inibitore diluendo il campione, ma in questo modo verrà diluito anche il DNA.

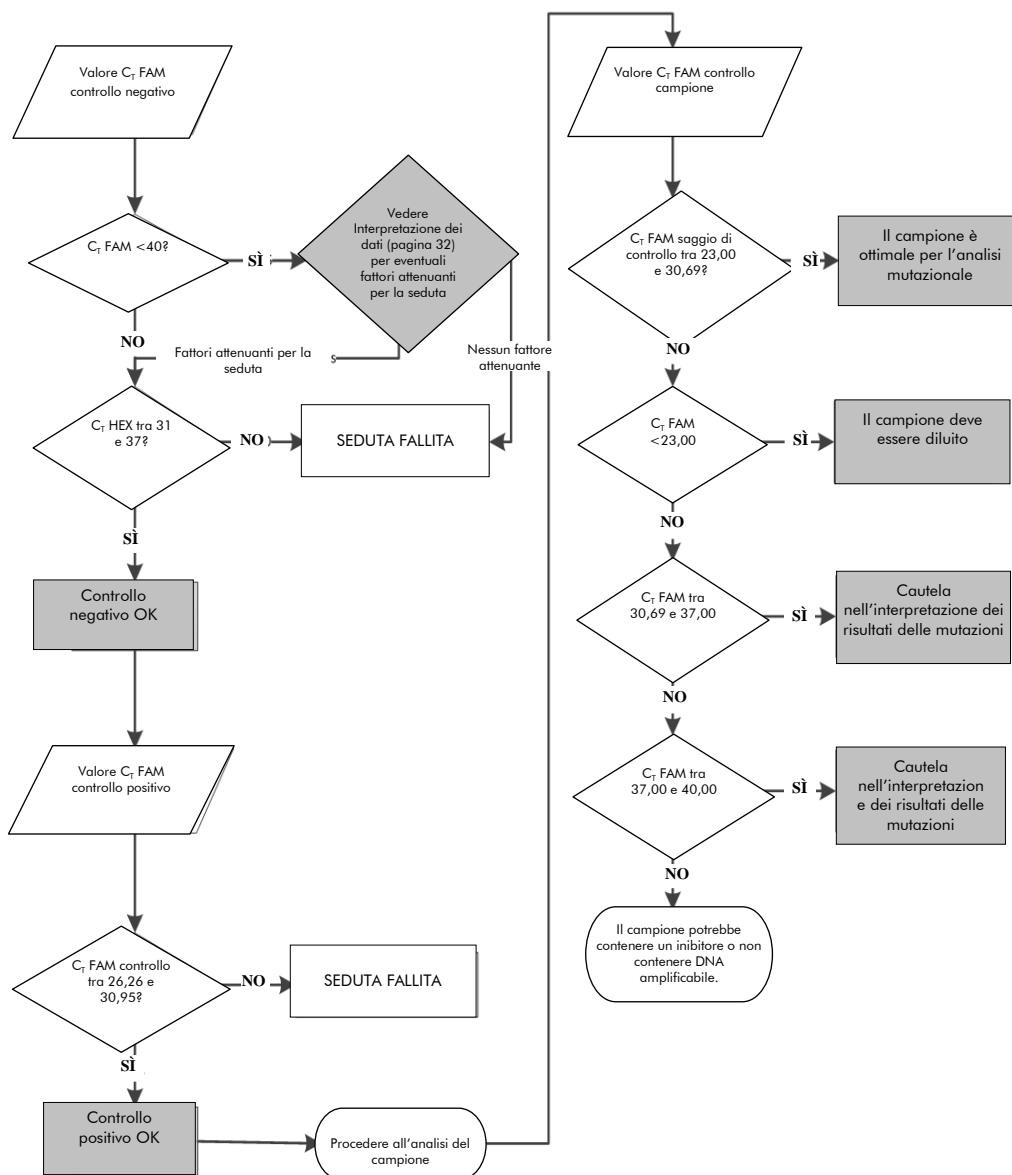


Figura 14. Flusso di lavoro per l'analisi della valutazione del campione.

Analisi dei dati delle mutazione EGFR

Al termine della seduta, è possibile analizzare i dati in base alla procedura seguente.

Impostazioni del software relative all'analisi

1. **Aprire il file appropriato utilizzando il software Rotor-Gene Q, versione 2.0.2 o successiva.**
2. **Verificare che i campioni siano marcati.**
3. **Dopo aver visualizzato la pagina del canale dei dati grezzi per ogni rilevatore/canale, fare clic su "Options" (Opzioni) e immettere Crop start cycles (Taglia cicli di avvio). Nella pagina con "Remove data before cycle" (Rimuovi dati prima del ciclo), immettere 15 e fare clic su "OK".**
4. **Fare clic su "Analysis" (Analisi). Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A (from 15), Yellow" (Ciclaggio A (da 15), Giallo) per visualizzare il canale HEX.**
5. **Assicurarsi che l'opzione "dynamic tube" (provetta dinamica) sia evidenziata. Fare clic su "Slope correct" (Slope corretto) e "Linear scale" (Scala lineare).**
6. **Impostare 0.02 per la soglia e controllare i valori C_T HEX.**
7. **Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A (from 15), Green" (Ciclaggio A (da 15), Verde) per visualizzare il canale FAM.**
8. **Assicurarsi che l'opzione "dynamic tube" (provetta dinamica) sia evidenziata. Fare clic su "Slope correct" (Slope corretto) e "Linear scale" (Scala lineare).**
9. **Impostare 0.075 per la soglia e controllare i valori C_T FAM.**

Analisi dei controlli della seduta:

Fare riferimento al diagramma di flusso "Analisi dei controlli della seduta" nella Figura 15.

- **Controllo negativo:** per confermare l'assenza di contaminazione da templat, il controllo NTC non deve generare un valore C_T inferiore a 40 nel canale verde (FAM). Per informazioni importanti sull'analisi dei grafici dei controlli NTC, fare riferimento a "Note per l'interpretazione dei dati" a pagina 42. Per confermare che la seduta sia stata allestita correttamente, l'amplificazione del valore C_T del controllo NTC deve essere compresa tra 31 e 37 nel canale giallo (HEX).

Se c'è amplificazione positiva nel canale verde e/o amplificazione al di fuori dell'intervallo 31-37 nel segnale giallo, i risultati del campione devono essere scartati.

- **Controllo positivo:** il controllo positivo (PC) EGFR deve generare un valore C_T del saggio di controllo compreso tra 26,26 e 30,95 nel canale verde. Una seduta con un valore C_T che non rientra in questo intervallo può indicare un problema di allestimento del saggio e deve essere considerata non valida. Se il valore C_T del saggio di controllo positivo è compreso tra 26,26 e 30,95 (esone 2, FAM), ma il valore C_T del controllo interno (HEX) non rientra nell'intervallo 31–37, andare avanti con l'analisi.

Per ogni saggio di mutazione calcolare il valore ΔC_T nel modo indicato di seguito, verificando che i valori C_T della mutazione e del controllo provengano dal controllo positivo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutazione} - C_T \text{ controllo}$$

I valori ΔC_T del controllo positivo (PC) EGFR devono rientrare negli intervalli di valori riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Valori ΔC_T attesi per il controllo positivo*

Saggio	Valore ΔC_T del controllo positivo
T790M	tra -2,88 e 3,01
Delezioni	tra -6,71 e 4,16
L858R	tra -2,41 e 0,90
L861Q	tra -4,61 e 1,48
G719X	tra -2,89 e 1,03
S768I	tra -3,37 e 2,31
Inserzioni	tra -2,93 e 1,28

* Software Rotor-Gene Q, versione 2.0.2

Nota: in caso di fallimento di un controllo positivo o negativo, non utilizzare i dati del campione.

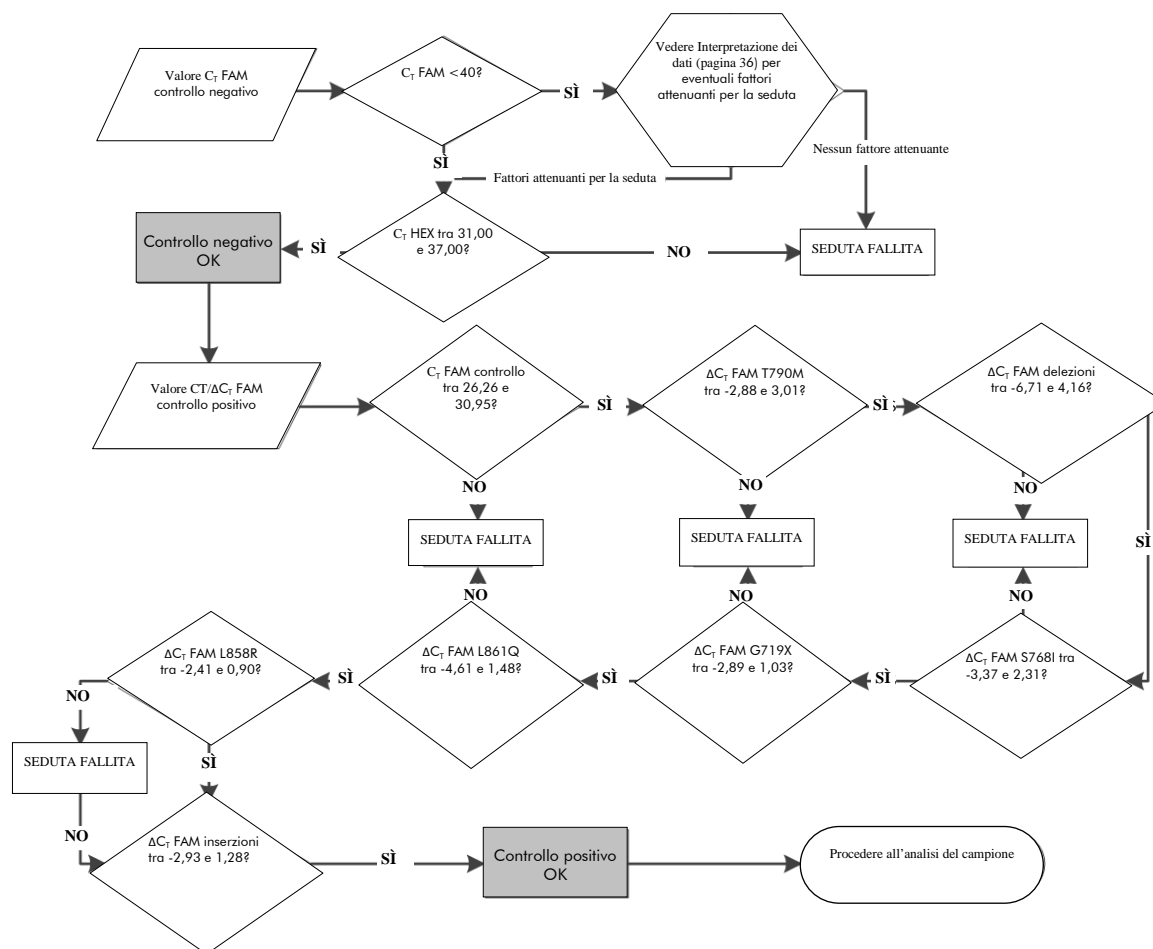


Figura 15. Flusso di lavoro per l'analisi dei controlli della seduta.

Analisi dei campioni:

Valore C_T FAM controllo campione

Posto che entrambi i controlli della seduta siano validi, ogni valore C_T del campione deve essere compreso tra 23 e 30,69 nel canale verde. Fare riferimento al diagramma di flusso "Analisi dei campioni" nella Figura 16.

- **Valore C_T saggio di controllo campione <23:** i campioni con un valore C_T di controllo <23 determineranno un sovraccarico per i saggi di mutazione, pertanto devono essere diluiti. Per rilevare ogni mutazione a un livello basso, i campioni troppo concentrati devono essere diluiti in modo da rientrare nell'intervallo di valori indicato, tenendo presente che diluendo della metà si aumenterà il C_T di 1.
- **Valore C_T saggio di controllo campione tra 30,69 e 37:** interpretare i dati con cautela, poiché le mutazioni di livello molto basso potrebbero non essere rilevate.

■ **Valore C_T saggio di controllo campione tra 37 e 40:** interpretare i dati con cautela, poiché verranno rilevate solo le mutazioni di livello molto alto.

■ **Valore C_T saggio di controllo campione >40:** il campione non contiene una quantità di DNA sufficiente per l'analisi.

Nota: se il valore C_T FAM del campione è compreso tra 23 e 37, non è necessario valutare il controllo interno.

Nota: se un campione non genera un valore C_T (cioè, $C_T > 40$), la causa potrebbe essere la presenza di un inibitore, un errore nell'allestimento del saggio o l'assenza di DNA di EGFR amplificabile.

■ **Valore C_T saggio di controllo interno tra 31 e 37:** il saggio funziona correttamente, ma non è presente DNA di EGFR amplificabile.

■ **C_T del saggio di controllo interno fuori dall'intervallo 31–37:** potrebbe indicare un errore di allestimento del saggio o la presenza di un inibitore. È possibile attenuare l'effetto di un inibitore diluendo il campione, ma in questo modo verrà diluito anche il DNA.

Nota: se la reazione FAM del saggio di mutazione non genera un valore C_T e le reazioni di controllo interno generano un valore C_T non compreso nell'intervallo 31–37, i dati dovranno essere scartati per la possibile presenza di inibitori che potrebbero portare a risultati falsi negativi. Diluendo il campione è possibile ridurre l'effetto degli inibitori, ma in questo modo anche il DNA viene diluito.

Valore C_T FAM saggio di mutazione campione

È necessario confrontare i valori FAM di tutte le sette miscele di reazione delle mutazioni con i valori riportati nella Tabella 8.

Tabella 8. Valori accettabili per la reazione di mutazione nel campione (FAM)*

Saggio	Intervallo C_T accettabile	Valore ΔC_T di cut-off
T790M	15,00–40,00	6,38
Delezioni	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Inserzioni	15,00–40,00	7,91

* I valori accettabili sono compresi in questo intervallo.

- Se il valore C_T FAM rientra nell'intervallo 15,00–40,00 specificato, il risultato è positivo all'amplificazione FAM.
- Se il valore C_T FAM è al di sopra dell'intervallo specificato o non c'è amplificazione, il risultato è negativo all'amplificazione FAM.

Per ogni campione di mutazione che esibisce un'amplificazione positiva, calcolare il valore ΔC_T nel modo indicato di seguito, verificando che i valori C_T della mutazione e del controllo provengano dallo stesso campione.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutazione} - C_T \text{ controllo}$$

Confrontare il valore ΔC_T del campione con il punto di cut-off del saggio in questione (Tabella 8), verificando che ad ogni saggio venga applicato il punto di cut-off corretto.

Il punto di cut-off è il punto al di sopra del quale potrebbe collocarsi un segnale positivo causato dal segnale di fondo del primer ARMS su DNA wild-type. Se il valore ΔC_T del campione è più alto del punto di cut-off, il campione viene classificato con "mutazione non rilevata" o oltre i limiti di sensibilità del kit. Se il valore del campione è più basso del punto di cut-off, il campione viene classificato come positivo a una mutazione rilevata dal saggio.

Nota: per i campioni che non presentano nessun valore C_T di mutazione FAM, è necessaria una valutazione del C_T del controllo interno (HEX) al fine di determinare se la mutazione non viene rilevata o se il saggio non è valido. Se il valore C_T HEX è compreso tra 31 e 37, la mutazione non viene rilevata. Se il valore C_T HEX non rientra nell'intervallo 31–37, il campione non è valido.

Per riassumere, ad ogni reazione di mutazione verrà assegnato uno stato di mutazione rilevata, mutazione non rilevata, oppure non valida sulla base dei criteri seguenti.

- **Mutation detected** (mutazione rilevata): risultato positivo all'amplificazione FAM e ΔC_T minore o uguale al valore di cut-off. Se vengono rilevate più mutazioni, possono essere indicate tutte nel report.
- **Mutation not detected** (mutazione non rilevata):
Risultato positivo all'amplificazione FAM e ΔC_T maggiore del valore di cut-off.
Risultato negativo all'amplificazione FAM e positivo all'amplificazione HEX (controllo interno).
- **Invalid** (non valida):
Risultato negativo all'amplificazione FAM e amplificazione HEX al di fuori delle specifiche.

Note per l'interpretazione dei dati

Amplificazione lineare

È necessario esaminare i grafici generati dallo strumento Rotor-Gene Q per tutte le reazioni. Talvolta è possibile osservare un aumento del segnale di fluorescenza nel controllo NTC e nei campioni negativi. Se è così e si è ottenuto un valore C_T , l'utente è tenuto a distinguere tra un vero evento di amplificazione, che potrebbe indicare una contaminazione nel controllo NTC, o un aumento lineare della fluorescenza, che potrebbe essere causato da un artefatto della fluorescenza.

Analisi del controllo NTC

Le figure 17 e 18 mostrano due esempi di comportamento dei campioni NTC. Nella Figura 17 è possibile osservare l'amplificazione non lineare (vera amplificazione) dovuta alla contaminazione del campione. La seduta deve

essere scartata e i campioni devono essere nuovamente analizzati. Nella Figura 18 è possibile osservare l'amplificazione lineare in un controllo NTC. In queste circostanze è necessario esaminare i dati grezzi della fluorescenza: Nella Figura 19 è illustrato il corrispondente grafico dei dati grezzi della fluorescenza, che indica un aumento lineare della fluorescenza anziché un vero evento di amplificazione. I dati di questa seduta sono utilizzabili, a condizione che il controllo positivo e il controllo interno abbiano prodotto risultati corretti. Per un confronto con la Figura 19, la Figura 20 mostra i dati grezzi della fluorescenza laddove si è verificata la vera amplificazione. In queste circostanze è necessario scartare i dati e analizzare nuovamente i campioni, in quanto si è in presenza di una contaminazione.

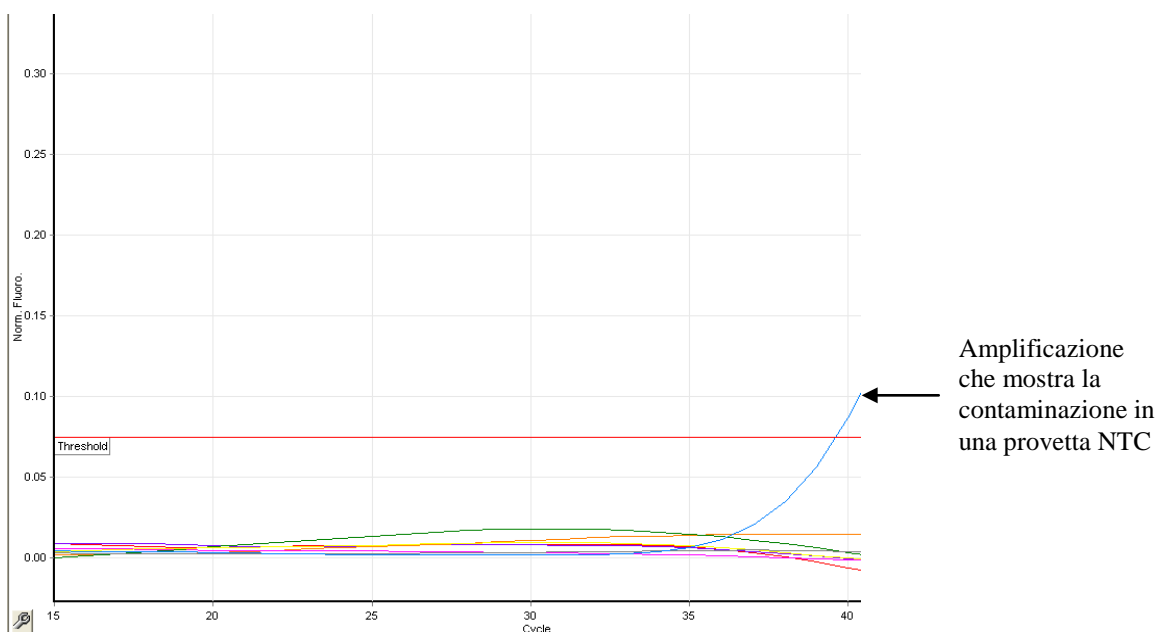


Figura 17. Contaminazione in un controllo NTC di un saggio in una seduta di analisi.

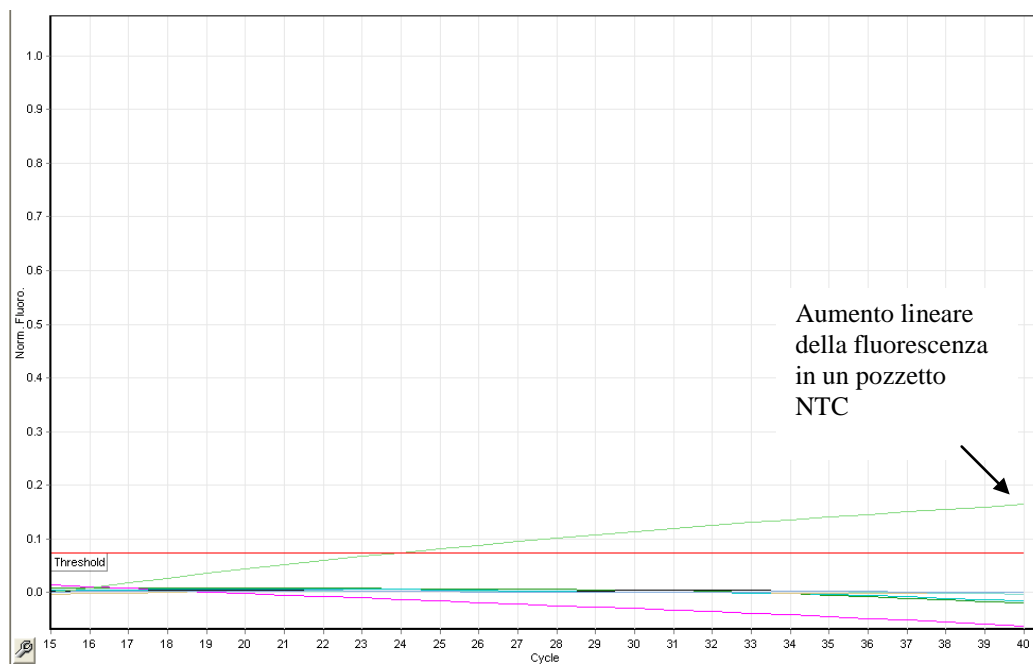


Figura 18. Esempio di aumento lineare della fluorescenza in un pozzetto NTC.

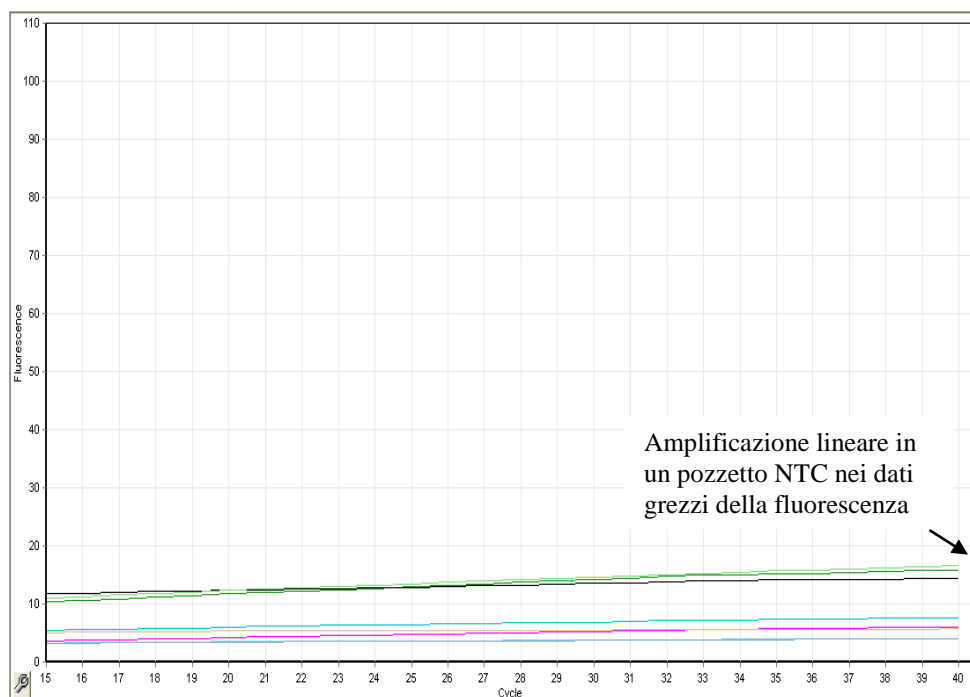


Figura 19. Dati grezzi della fluorescenza della Figura 18.

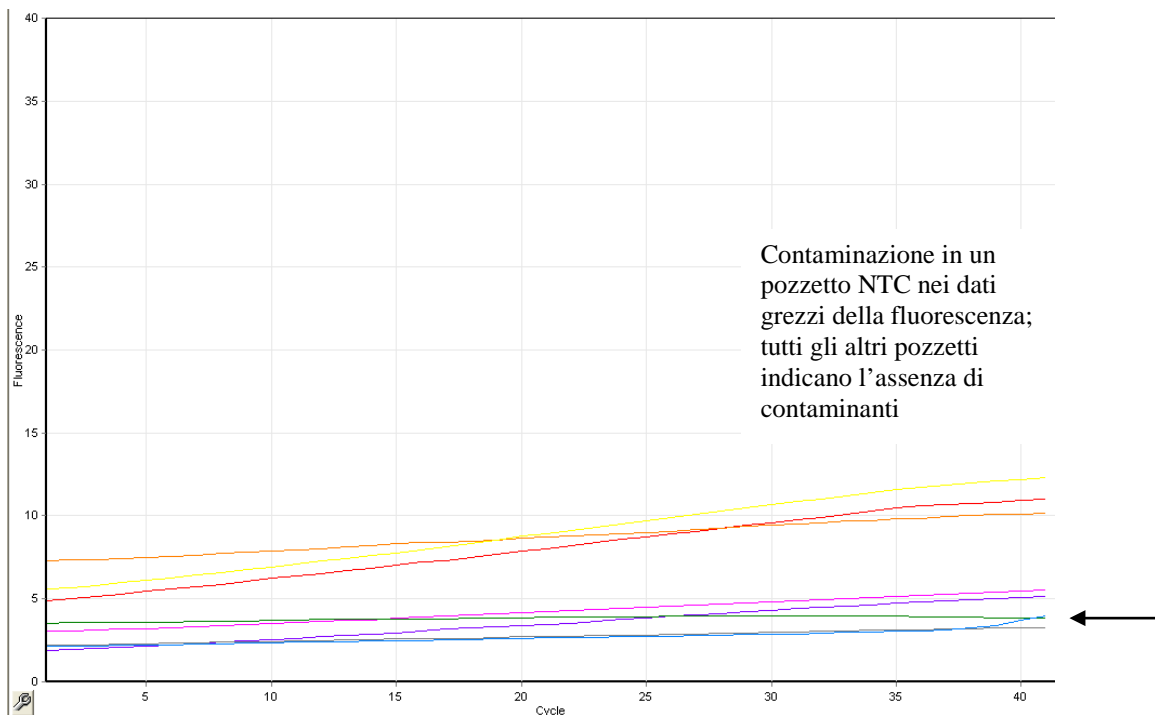


Figura 20. Dati grezzi della fluorescenza che mostrano un pozzetto NTC con un vero evento di amplificazione.

Analisi dei campioni

Nelle figure 21 e 22 sono illustrati due esempi di amplificazione nelle reazioni dei campioni. Nella Figura 21 è possibile osservare la vera amplificazione in un pozzetto contenente un campione in una seduta di analisi. Se una seduta genera questo tipo di curva di amplificazione sigmoideale, si tratta di vera amplificazione e i dati di tale seduta possono essere utilizzati, a condizione che il controllo positivo e il controllo interno abbiano prodotto risultati corretti.

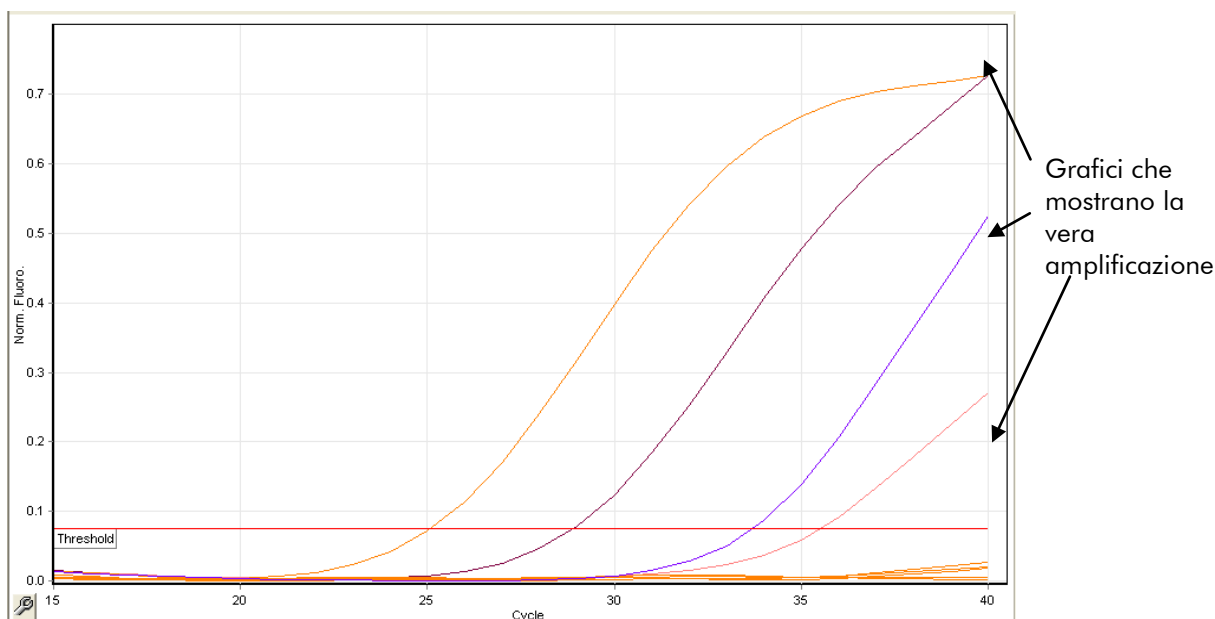


Figura 21. Vera amplificazione in un pozzetto contenente un campione in una seduta di analisi.

Nella Figura 22 è possibile osservare un esempio di amplificazione lineare in una reazione di un campione. In queste circostanze è necessario esaminare i dati grezzi della fluorescenza. Il corrispondente grafico dei dati grezzi della fluorescenza (Figura 23) indica che l'aumento lineare osservato nella Figura 22 corrisponde all'aumento lineare nei dati grezzi della fluorescenza e non è un vero evento di amplificazione. Purché il controllo interno e il controllo positivo abbiano prodotto risultati corretti, è possibile utilizzare i risultati dei campioni di queste sedute con cautela, tanto che l'amplificazione lineare viene definita "no C_T ".

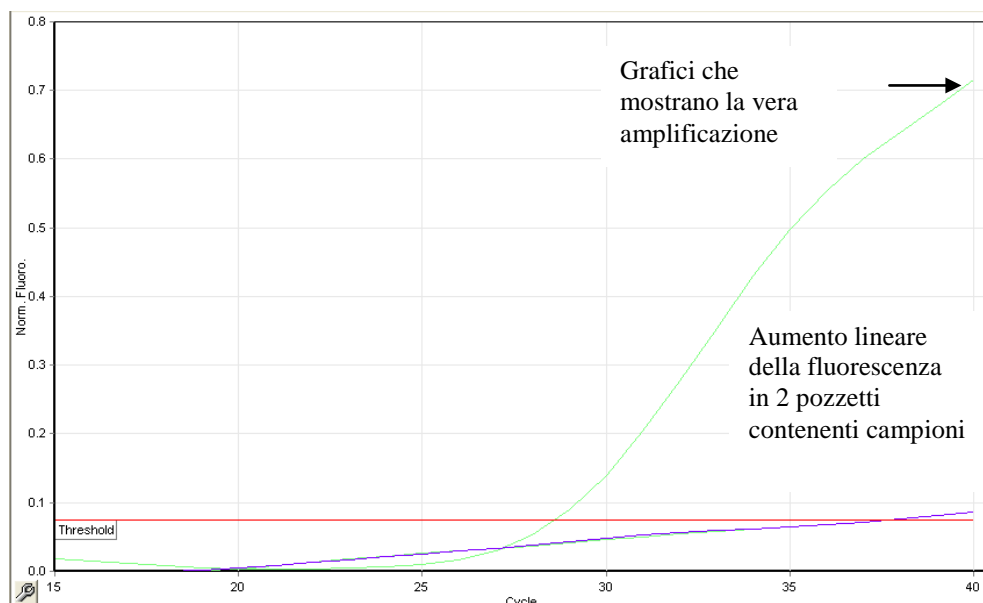


Figura 22. Esempio di aumento lineare della fluorescenza in due pozzetti contenenti campioni.

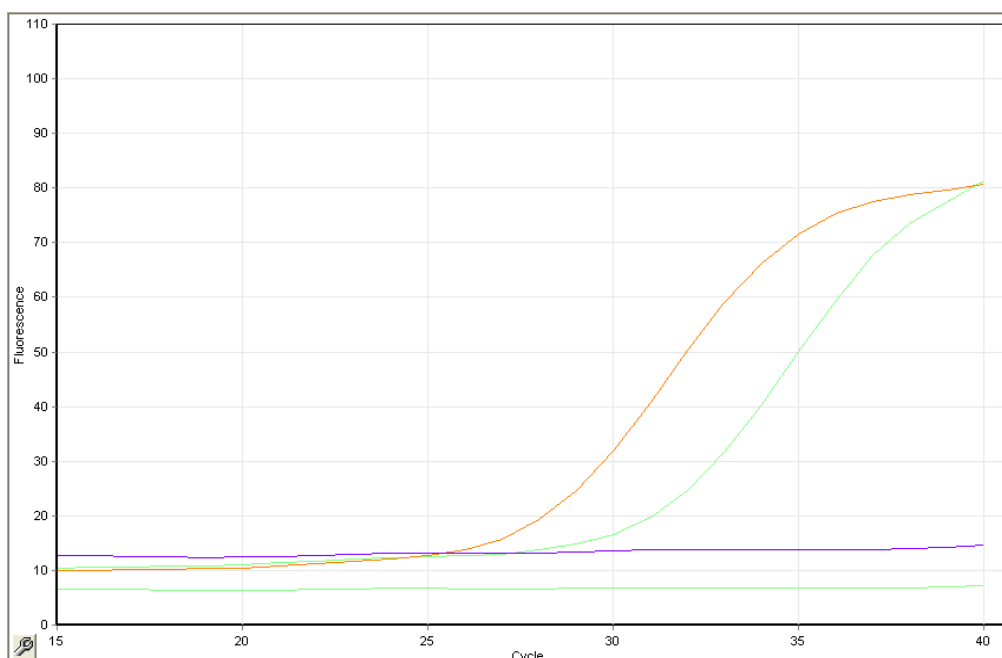


Figura 23. Dati grezzi della fluorescenza della Figura 22.

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

Nessun segnale con il controllo positivo (PC) EGFR nel canale di fluorescenza Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati PCR non è conforme al protocollo | Per l'analisi dei dati, selezionare il canale di fluorescenza Cycling Green per la PCR analitica EGFR e il canale di fluorescenza Cycling Yellow per la PCR del controllo interno. |
| b) Programmazione errata del profilo delle temperature dello strumento Rotor-Gene | Confrontare il profilo delle temperature con il protocollo e, in caso di discrepanza, ripetere la seduta. |

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|---|
| c) Configurazione errata della PCR | Controllare i passaggi della procedura facendo riferimento allo schema di pipettamento, quindi ripetere la PCR se necessario. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non sono conformi alle istruzioni fornite nel paragrafo "Conservazione e gestione dei reagenti" (pagina 12) | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta del kit) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |
| e) Il kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR è scaduto | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta del kit) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |

Segnali con i controlli negativi nel canale di fluorescenza Cycling Green della PCR analitica

- | | |
|---|--|
| a) Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR | Ripetere la PCR con nuovi reagenti in replicato.
Se possibile, chiudere le provette PCR subito dopo l'aggiunta del campione da analizzare.
Assicurarsi che lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano periodicamente decontaminati. |
| b) Si è verificata una contaminazione durante l'estrazione | Ripetere l'estrazione e la PCR del campione da analizzare, utilizzando nuovi reagenti.
Assicurarsi che lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano periodicamente decontaminati. |

Controllo di qualità

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

Limitazioni

I risultati ottenuti usando il prodotto devono essere interpretati congiuntamente a tutti i riscontri clinici e di laboratorio pertinenti e non devono essere utilizzati da soli a scopo di diagnosi.

Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale preparato e specializzato nelle procedure di diagnostica in vitro e nell'uso del sistema Rotor-Gene Q.

Sono stati eseguiti studi di validazione analitica su DNA umano estratto da campioni tumorali FFPE.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso sul ciclatore per Real-time PCR Rotor-Gene Q, serie 5plex HRM.

Per ottenere risultati ottimali, è necessario osservare scrupolosamente le istruzioni contenute nel Manuale del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. La diluizione dei reagenti, salvo con le modalità descritte in questo manuale, è sconsigliata in quanto potrebbe determinare un decadimento delle prestazioni.

È importante eseguire una valutazione della quantità e della qualità del DNA nel campione prima di sottoporre quest'ultimo all'analisi con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Viene fornita una miscela di reazione di controllo (Ctrl) supplementare per determinare se il valore C_T è accettabile per il saggio. Le letture dell'assorbanza non devono essere utilizzate, in quanto non hanno nessuna correlazione con i valori C_T nei campioni di DNA frammentato.

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Caratteristiche prestazionali

Cut-off

Sono stati analizzati 171 campioni FFPE con un metodo conforme alle linee guida NCCLS EP17-A (2004). I dati dei 159 campioni sono stati utilizzati per definire i valori di cut-off del kit. L'intervallo C_T della reazione di controllo è stato fissato tra 23,00 e 30,69 C_T . I valori di cut-off fissati sono riportati nella Tabella 8.

Limite di sensibilità

Per determinare il limite di sensibilità (limit of detection, LOD) del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è stata sviluppata una serie di campioni miscelando DNA mutante sintetico con DNA genomico wild-type, in modo da simulare una gamma di percentuali di mutazione per ognuna delle

29 mutazioni. Il valore LOD di ogni saggio è definito come mutazione percentuale in corrispondenza della quale il 95% dei campioni in replica è risultato positivo con il kit *therascreen* EGFR PCR RGQ. I valori LOD sono riportati nella Tabella 9. Per i saggi multiplex, che rilevano più di una mutazione (G719X, delezioni e inserzioni), viene indicato il valore della reazione con valore LOD più elevato.

Tabella 9. Valori LOD per ognuno dei sette saggi di mutazione EGFR

Mutazione	Mutazione percentuale rilevabile (%)
T790M	7,02
Delezioni	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Inserzioni	2,03

Precisione

Per determinare la precisione del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è stata sviluppata una serie di campioni miscelando DNA mutante sintetico con DNA genomico wild-type per simulare una gamma di percentuali di mutazione per ognuno dei sette saggi di mutazione. La precisione è stata valutata analizzando i campioni in uno stesso laboratorio, usando più lotti del kit e più operatori ed eseguendo più sedute in giorni diversi, con due repliche di ogni campione. La variazione osservata, in termini di deviazione standard stimata rispetto all'analisi delle componenti della varianza, è stata inferiore a 1 ΔC_T e può essere utilizzata come stima della precisione (Tabella 10).

Tabella 10. Risultati dei test nello stesso laboratorio*

Saggio	Percentuale di test positivi alla mutazione	Stima della deviazione standard (ΔC_T)
T790M	100%	0,33
Delezioni	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Inserzioni	97,9%	0,38

* Sono stati analizzati 93 campioni in replica per ogni mutazione.

Riproducibilità

La riproducibilità è stata valutata analizzando campioni con livelli di mutazione elevati su un fondo di DNA genomico wild-type in tre laboratori distinti, usando più lotti del kit e più operatori ed eseguendo più sedute in giorni diversi, con due repliche di ogni campione. Per tutti i sette saggi di mutazione, il 96,1-100% dei campioni con DNA mutante sono risultati positivi alla mutazione. I campioni wild-type sono risultati negativi alla mutazione per tutti i saggi eseguiti in tutti i laboratori.

Effetto della concentrazione del DNA iniziale

Per determinare quale effetto possa avere la variazione nella concentrazione del DNA iniziale sui risultati vicini al limite di sensibilità (LOD) ottenuti con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è stata sviluppata una serie di campioni per tutte le 29 mutazioni miscelando DNA mutante sintetico con DNA genomico wild-type al fine di produrre campioni con un livello di DNA iniziale basso, medio e alto.

Per i livelli di DNA iniziale alto e basso è stato preso come riferimento l'intervallo di valori C_T del saggio di controllo: 23,50–29,50.

Una valutazione dell'insieme dei dati per il DNA iniziale (29 mutazioni, a concentrazioni vicine al valore LOD e a tre livelli di DNA iniziale diversi) ha rivelato un tasso del 95,44% di positività alle mutazioni.

Questi dati indicano che la variazione del livello di DNA iniziale (entro l'intervallo operativo del saggio) non incide sul valore ΔC_T o sul risultato di positività alla mutazione per un campione.

Sostanze interferenti

È stato valutato il potenziale effetto carryover di alcune sostanze sulle prestazioni del kit, durante la fase di estrazione dei campioni con il prodotto QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Sono stati utilizzati formalina, cera di paraffina, xilene, etanolo, tampone ATL, proteinasi K, tampone AL, tampone di lavaggio AW1 e tampone di lavaggio AW2 alle concentrazioni massime attese ("caso peggiore"), supponendo che ogni fase di lavaggio o purificazione nel protocollo del kit di estrazione producesse una riduzione nel componente della concentrazione pari a 1 log.

Per lo studio sono stati utilizzati campioni con un limite di sensibilità (LOD) tre volte maggiore, invece di un livello molto più alto di mutazione, per assicurare che tutte le potenziali interferenze fossero rilevate.

Come indicatore di una possibile interferenza, è stata scelta una differenza del valore $\Delta C_T \geq 3$ deviazioni standard (valore ottenuto dallo studio sulla precisione) tra il "test" e il "controllo" (ovvero, senza sostanze interferenti).

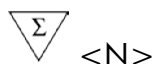
Nessuna delle potenziali sostanze interferenti prese in esame ha determinato una variazione del $\Delta C_T \geq 1$ deviazione standard se confrontata con i controlli.

Riferimenti bibliografici

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

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

Simboli



Contenuto sufficiente per <N> test



Utilizzare entro



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Codice del lotto



Numero di materiale



Componenti



Contenuto



Numero



Limiti di temperatura



Produttore



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale

Indirizzi utili

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support, 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: Dettagli delle mutazioni

La fonte degli ID COSMIC è il *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabella 11. Elenco di mutazione e ID COSMIC.

Mutazione	Esone	Cambiamento di base	ID COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Inserzioni	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delezioni	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (complesso)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (complesso)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (complesso)	12422
		2238_2252>GCA (complesso)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Tabella 11. Elenco delle mutazioni e ID COSMIC (continua)

Mutazione	Esone	Cambiamento di base	ID COSMIC
Delezioni	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complesso)	12382
		2239_2258>CA (complesso)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complesso)	12383

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: 1 saggio di controllo, 7 saggi di mutazione, controllo positivo, Taq DNA polimerasi	870111
Rotor-Gene Q e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training non inclusi	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training non inclusi	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Ciclatore per PCR Real-time e analizzatore HRM (High Resolution Melt) con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno sulle parti e su funzionalità, installazione e training	9001580

Prodotto	Contenuto	N° di catalogo
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per l'allestimento manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo in provette 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106

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

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Acquistando il presente prodotto si acquisisce il diritto all'uso dello stesso per lo svolgimento di servizi diagnostici nell'ambito della diagnostica umana in vitro. L'acquisto non costituisce concessione di licenze generali o di altre licenze di nessun altro tipo, salvo questo specifico diritto all'uso.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è un dispositivo diagnostico con marchio CE, conforme alla Direttiva Europea 98/79/CE per la diagnostica in vitro. Non disponibile in tutti i Paesi.

Contratto di licenza limitata per il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

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 costituiscono 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.

© 2012–2013 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

