

Gennaio 2019

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



Versione 2



Per uso diagnostico in vitro

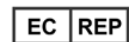
Per l'uso con gli strumenti Rotor-Gene[®] Q MDx



874111



QIAGEN Manchester Ltd Skelton House, Lloyd Street North,
Manchester, M15 6SH, Regno Unito



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA



1116287IT



Indice

Uso previsto	6
Sommario e spiegazioni.....	7
Principio della procedura	9
Materiali in dotazione.....	14
Contenuto del kit.....	14
Materiale necessario ma non fornito	15
Avvertenze e precauzioni	17
Precauzioni generali	17
Conservazione e manipolazione dei reagenti	19
Condizioni per la spedizione.....	19
Condizioni per la conservazione.....	19
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	20
Procedura	21
Estrazione e preparazione del DNA	21
Protocollo: Valutazione del campione	22
Protocollo: rilevazione delle mutazioni EGFR	36
Interpretazione dei risultati (automatica)	49
Avvisi del software Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	51
Guida alla risoluzione dei problemi	57
Controllo di qualità	58
Limitazioni	58
Caratteristiche prestazionali.....	59

Prestazioni analitiche	59
Limite del bianco (LOB), intervallo valido e valori di cut-off	59
Impatto del DNA iniziale sui valori ΔC_T	60
Reattività crociata	61
Accuratezza: confronto con il metodo di riferimento analitico	61
Limite di sensibilità	62
Interferenza	64
Riproducibilità	64
Prestazioni cliniche	67
Risultati clinici GIOTRIF®	67
Risultati clinici IRESSA®	69
Riferimenti	72
Simboli	74
Appendice A: protocollo del kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR per la procedura manuale ...	75
Informazioni generali	75
Protocollo: creazione di un profilo di temperature	75
Procedura (manuale)	86
Protocollo: valutazione dei campioni (manuale)	86
Protocollo: rilevazione delle mutazioni EGFR (manuale)	86
Protocollo: configurazione del Rotor-Gene Q per il kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR	87
Interpretazione dei risultati (manuale)	92
Impostazioni del software relative all'analisi	92
Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni	93
Analisi dei dati per la rilevazione della mutazione EGFR	95

Appendice B: installazione del software <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package	104
Informazioni di contatto.....	107
Informazioni per gli ordini	108
Cronologia delle revisioni del manuale	110

Uso previsto

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è un test di diagnostica in vitro destinato alla rilevazione di 29 mutazioni somatiche nel gene EGFR (epidermal growth factor receptor, recettore del fattore di crescita epidermico). Fornisce una valutazione qualitativa dello stato mutazionale in campioni tumorali di pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

I risultati possono aiutare il medico a identificare i pazienti NSCLC che potrebbero rispondere meglio alle terapie con inibitori della tirosin-chinasi di EGFR.

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR consente di analizzare i campioni di DNA estratti dai tessuti tumorali fissati in formalina e inclusi in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) di pazienti NSCLC utilizzando uno strumento Rotor-Gene Q MDx. L'uso del kit è riservato a professionisti qualificati in un ambiente di laboratorio.

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

Sommario e spiegazioni

Nei carcinomi umani vengono riscontrate mutazioni nell'oncogene EGFR (1, 2). La presenza di queste mutazioni è correlata alla risposta a determinate terapie basate sugli inibitori della tirosin-chinasi (tyrosine kinase inhibitor, TKI) nei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) (3-8). Tali mutazioni nell'oncogene EGFR sono presenti nella popolazione generale dei pazienti NSCLC, con una frequenza del 10% circa nei pazienti in USA, Europa e Australia e anche del 30% nei pazienti in Giappone e Taiwan (1, 2, 9).

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

Grazie all'uso delle tecnologie Scorpions® (10) e ARMS (Amplification Refractory Mutation System, sistema di mutazioni refrattarie all'amplificazione) (11), il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR consente di identificare 29 mutazioni negli esoni 18, 19, 20 e 21 dell'oncogene EGFR su un fondo di DNA genomico wild type (Tabella 1). In sintesi:

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

I metodi utilizzati nel kit sono altamente selettivi e, a seconda della quantità totale di DNA presente, consentono di rilevare una percentuale bassa di DNA 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.

Tabella 1. Elenco delle mutazioni e identità COSMIC

Esone	Mutazione	ID COSMIC*	Cambiamento delle basi
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Delezioni	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
		12383	2239_2251>C

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Tabella 1. Continua Elenco delle mutazioni e identità COSMIC

Esone	Mutazione	ID COSMIC*	Cambiamento delle basi
20	S768I	6241	2303G>T
	Inserzioni	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Principio della procedura

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR include otto distinte miscele delle reazioni di amplificazione PCR: sette reazioni specifiche per le mutazioni negli esoni 18, 19, 20 e 21 dell'oncogene EGFR e un controllo wild-type nell'esone 2. I principali componenti del kit sono illustrati di seguito.

ARMS

La tecnologia ARMS consente l'amplificazione allele-specifica o mutazione-specifica. 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. Durante la PCR, quando la sonda si lega all'amplicone, il fluoroforo e il quencher si scindono determinando un aumento rilevabile della fluorescenza.

Formato del kit

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

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

Tutte le miscele delle reazioni contengono reagenti sufficienti per rilevare i target marcati con carbossifluoresceina (FAMTM), più un saggio di un controllo interno marcato con esaclorofluoresceina (HEXTM). 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.

Saggi

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR prevede una procedura in due fasi. Nella prima fase viene eseguito il saggio di controllo, in modo da valutare la quantità totale di DNA EGFR amplificabile in un campione; nella seconda fase vengono eseguiti i saggi di mutazione e controllo, in modo da determinare la presenza o l'assenza di DNA mutante.

Saggio di controllo

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

Saggi di mutazione

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

Controlli

Nota: tutte le sedute analitiche devono includere sia controlli positivi che controlli negativi.

Controllo positivo

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

Controllo negativo

Per ogni seduta è necessario includere un controllo negativo senza template ("no template control", NTC) nelle provette 9-16. Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR contiene acqua da utilizzare come "template" per il controllo NTC. Il controllo NTC serve per valutare sia le potenziali contaminazioni durante la configurazione del processo, sia le prestazioni della reazione di controllo interno.

Valutazione della reazione di controllo interno

Ogni miscela di reazione contiene un controllo interno (IC), oltre alla reazione target. Un errore indica la possibile presenza di inibitori, che possono indurre risultati imprecisi, o un possibile errore commesso dall'operatore nella fase di configurazione del processo per la provetta interessata. L'IC utilizza una sequenza target oligonucleotidica non correlata al gene EGFR, un primer non marcato e un primer Scorpions marcato con HEX, che lo differenzia dai primer Scorpions marcati con FAM nelle miscele delle reazioni per le mutazioni e i controlli. L'amplificazione FAM può entrare in competizione con l'amplificazione dell'IC, cosicché il valore IC C_T (HEX) generato potrebbe non rientrare nell'intervallo specificato. I risultati FAM restano comunque validi per questi campioni.

Valutazione del campione

È fortemente consigliato l'uso della miscela della reazione di controllo (provetta CTRL), fornita con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, per valutare la quantità totale di DNA EGFR amplificabile in un campione. Il saggio di controllo amplifica una regione dell'esone 2 del gene EGFR. È consigliabile configurare i campioni con il solo saggio di controllo, utilizzando l'EGFR PC come controllo positivo e l'acqua come "templato" del controllo senza templato.

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

Piattaforma e software

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è formulato in modo specifico per l'uso con gli strumenti Rotor-Gene Q MDx. Lo strumento Rotor-Gene Q MDx è programmato per parametri di ciclaggio (sedute) differenti, da eseguire con *therascreen* EGFR CE Assay Package.

Il software *therascreen* EGFR CE Assay Package include due modelli: “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” per la valutazione del campione di DNA e “*therascreen* EGFR CE Locked Template” per la rilevazione delle mutazioni KRAS. Tali modelli contengono i parametri della seduta PCR e calcolano i risultati.

È inoltre possibile utilizzare il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con il software Rotor-Gene Q versione 2.3 in modalità aperta (cioè senza utilizzare il Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Per i dettagli, vedere “Appendice A: protocollo *del* kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per la procedura manuale” a pagina 75.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR				(24)
N° di catalogo				874111
Numero di reazioni				24
Colore	Identificazione	ID provetta		Volume
Rosso	Control Reaction Mix (Miscela reazione di controllo)	1	CTRL	2 × 600 µl
Viola	Miscela reazione T790M	2	T790M	600 µl
Arancione	Deletions Reaction Mix (Miscela reazione delezioni)	3	Del	600 µl
Rosa	Miscela reazione L858R	4	L858R	600 µl
Verde	Miscela reazione L861Q	5	L861Q	600 µl
Giallo	Miscela reazione G719X	6	G719X	600 µl
Grigio	S768I Reaction Mix (Miscela reazione S768I)	7	S768I	600 µl
Blu	Insertions Reaction Mix (Miscela reazione inserzioni)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (Controllo positivo EGFR)	9	PC	300 µl
Verde menta	Taq DNA polimerasi	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
Bianco	Acqua priva di nucleasi per controllo senza template	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Bianco	Acqua priva di nucleasi per diluizione	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook</i> (Manuale del kit <i>therascreen EGFR RGQ PCR</i>)				1

Materiale necessario ma non fornito

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

Reagenti

- Kit di estrazione del DNA (vedere "Estrazione e preparazione del DNA" a pagina 21)

Materiali di consumo e attrezzatura generica da laboratorio

- Pipette dedicate* (regolabili) per la preparazione dei campioni
- Pipette dedicate* (regolabili) per la preparazione della soluzione Master Mix PCR
- Pipette dedicate* (regolabili) per la dispensazione del DNA template
- Puntali per pipette sterili prive di DNasi, RNasi e DNA dotati di filtri (per evitare contaminazioni crociate, è consigliabile utilizzare puntali per pipette dotati di barriere anti-aerosol)
- Provette e tappi per strisce, 0,1 ml, da usare con rotore a 72 pozzetti (n° cat. 981103 o 981106)
- Provette per microcentrifuga prive di DNasi, RNasi e DNA per la preparazione di miscele Master Mix
- Blocco di caricamento per 72 provette da 0,1 ml; blocco in alluminio per l'allestimento manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo (n° cat. 9018901)
- 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 2ml
- Miscelatore vortex*

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

Apparecchiatura per PCR

- Strumento Rotor-Gene Q MDx con canali di fluorescenza per Cycling Green e Cycling Yellow (rilevazione di FAM ed HEX, rispettivamente)*†
- Rotor-Gene Q versione software 2.3
- CD Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package versione 3.0.5 (n° cat. 9023537)

Nota: il software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package deve essere eseguito con la versione 2.3 del software Rotor-Gene Q.

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

† In alcuni Paesi è possibile utilizzare lo strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione maggio 2011 o successiva. La data di produzione può essere ricavata dal numero di serie sul retro dello strumento. Il numero di serie è nel formato "mmaannn", dove "mm" indica il mese di produzione in cifre, "aa" indica le ultime due cifre dell'anno di produzione e "nnn" indica l'ID univoco dello strumento.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

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

Per informazioni sulla sicurezza riguardanti lo strumento Rotor-Gene Q, consultare il manuale utente fornito insieme allo strumento.

Smaltire i campioni e i materiali di scarto secondo le disposizioni locali in materia di sicurezza.

Precauzioni generali

Prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni:

- Il test è destinato all'uso con campioni di tessuto NSCLC fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- Conservare ed estrarre il materiale positivo (campioni e controlli positivi) separatamente da tutti gli altri reagenti e aggiungerli alla miscela di reazione in un'area del laboratorio separata.
- 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 per la preparazione delle miscele delle reazioni e l'aggiunta del DNA template. La preparazione e la dispensazione 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 da laboratorio con i prodotti post-PCR.

- Tutte le sostanze chimiche e i materiali biologici sono potenzialmente pericolosi. I campioni dei pazienti e i campioni analitici sono potenzialmente infettivi e devono essere trattati come materiale a rischio biologico.
- I reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono diluiti in percentuali ottimali. Non diluire ulteriormente i reagenti, in quanto ciò potrebbe provocare una perdita a livello di prestazioni. Non utilizzare volumi delle reazioni (miscela di reazione più campione) inferiori a 25 µl, in quanto il rischio di falsi negativi potrebbe aumentare.
- Tutti i reagenti forniti nel kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Non sostituire i reagenti nel kit *therascreen* EGFR RGQ PCR o tra kit *therascreen* EGFR RGQ PCR diversi, altrimenti le prestazioni potrebbero risentirne.
- Utilizzare soltanto la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) che viene fornita con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. 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.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Nota: assicurare che i test sui campioni vengano svolti correttamente, prestando particolare attenzione agli errori di immissione dei campioni, agli errori di caricamento e agli errori di pipettamento.

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.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Condizioni per la spedizione

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR viene spedito in ghiaccio secco e deve essere congelato alla consegna. Se il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR non dovesse essere congelato alla consegna, 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 il servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Condizioni per la conservazione

Alla consegna riporre immediatamente il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR in un congelatore termoregolato e conservarlo tra -30 e -15°C al riparo dalla luce. Evitare di esporre alla luce diretta i primer Scorpions (e in generale tutte le molecole marcate con fluorescenza) in modo da prevenire il loro fotodecadimento e il deterioramento delle prestazioni. Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, se conservato alle condizioni indicate e nella confezione originale. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente. Si consigliano al massimo otto cicli di congelamento-scongelo.

I reagenti devono scongelarsi a temperatura ambiente (15-25°C) per minimo 1 ora e massimo 4,5 ore. Quando i reagenti sono pronti per l'uso, è possibile preparare le reazioni PCR e le provette Rotor-Gene Q, che contengono le soluzioni Master Mix e il campione di DNA, devono essere caricate immediatamente sullo strumento Rotor-Gene Q MDx. Fare attenzione a non superare il tempo totale dall'inizio della preparazione della PCR all'avvio del processo:

- 6 ore se la conservazione avviene a temperatura ambiente

Nota: i tempi includono sia la preparazione della PCR che la conservazione.

- 18 ore se la conservazione avviene in frigorifero (2-8°C)

Nota: i tempi includono sia la preparazione della PCR che la conservazione.

Nota: per garantire funzionamento e prestazioni ottimali, evitare di esporre alla luce diretta i primer Scorpions (e in generale tutte le molecole marcate con fluorescenza) per prevenire il loro 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 manipolazione dei campioni

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

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

I campioni tumorali 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. È possibile che il DNA appartenente al tessuto non tumorale non contenga le mutazioni rilevate dal kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Per preparare i campioni di tessuto per l'estrazione del DNA:

- Utilizzando materiali e metodi standard, fissare il campione di tessuto in formalina 10% neutra tamponata e includere il campione di tessuto in paraffina. Utilizzando un microtomo tagliare sezioni seriali di 5 µm dal blocco di paraffina e montarle su vetrini di vetro.
- Affidare a un professionista qualificato (ad esempio un patologo) lo studio di una sezione colorata con ematossilina eosina (EE) per confermare la presenza del tumore.
- Le sezioni colorate non devono essere utilizzate per l'estrazione del DNA.
- Conservare tutti i blocchi FFPE e i vetrini a temperatura ambiente (15-25°C). I vetrini possono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 1 mese prima dell'estrazione del DNA.

Procedura

Estrazione e preparazione del DNA

Le caratteristiche prestazionali di questo kit sono state generate utilizzando DNA estratto con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n° cat. 60404). Questo kit dovrebbe essere usato per la preparazione del DNA, se disponibile nel Paese dell'utente. Se si utilizza il kit QIAamp DNA FFPE Tissue (n° cat. 56404), equivalente in termini di funzionalità, l'estrazione del DNA deve essere eseguita nel rispetto delle istruzioni contenute nel manuale, **osservando quanto segue**:

- Non utilizzare la soluzione di deparaffinazione QIAGEN. Per la deparaffinazione utilizzare esclusivamente il metodo con xilene/etanolo descritto nel manuale del kit *QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Accertarsi di utilizzare etanolo per biologia molecolare* per tutti i passaggi richiesti.

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

- Utilizzando uno scalpello nuovo per ogni campione, raschiare l'intera area del tessuto da due sezioni e raccoglierlo in una provetta per microcentrifuga provvista di etichetta.
- La digestione con proteinasi K (passaggio 11 del manuale del kit *QIAamp DNA FFPE Tissue*) deve durare 1 ora \pm 5 minuti a $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- La digestione con proteinasi K (passaggio 12 del manuale del kit *QIAamp DNA FFPE Tissue*) deve durare 1 ora \pm 5 minuti a $90^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Non utilizzare il passaggio relativo all'RNasi descritto nel manuale del kit *QIAamp* per l'estrazione di DNA da tessuti FFPE (manuale del kit *QIAamp DNA FFPE Tissue*).
- I campioni devono essere eluiti in 120 μl di tampone di eluizione (buffer ATE) contenuto nel kit *QIAamp DNA FFPE Tissue* (passaggio 20 del manuale del kit *QIAamp DNA FFPE Tissue*).
- Il DNA genomico può essere conservato tra 2°C e 8°C per 1 settimana dopo l'estrazione o tra -30°C e -15°C per un massimo di 8 settimane prima dell'uso.

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

Protocollo: Valutazione del campione

Questo protocollo consente di valutare il DNA totale amplificabile presente nei campioni mediante l'uso del modello "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" del software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package per la valutazione automatizzata dei campioni.

Nota: per la valutazione manuale del DNA del campione, vedere "Appendice A: protocollo del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per la procedura manuale" a pagina 75.

Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere "Precauzioni generali", pag. 17.
- Acquisire esperienza con l'uso dello strumento Rotor-Gene Q MDx prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- Non agitare in vortex la *Taq* o qualsiasi miscela contenente *Taq*, in quanto l'enzima potrebbe inattivarsi.
- Pipettare la *Taq* inserendo il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, evitando che il puntale si cosparga eccessivamente di enzima.
- La miscela reazione di controllo disponibile è sufficiente per valutare fino a 24 campioni.

Prima di iniziare

- Prima di utilizzare lo strumento Rotor-Gene Q MDx, assicurarsi che il software *therascreen* EGFR CE Assay Package sia installato (vedere "Appendice B: installazione del software *therascreen* EGFR CE Assay Package" a pagina 104).
- Prima di ogni uso, è necessario lasciare scongelare tutti i reagenti per almeno 1 ora a temperatura ambiente (15-25°C) ma senza superare 4,5 ore, quindi miscelare capovolgendo per 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta.
- Miscelare tutti i campioni capovolgendo 10 volte e centrifugando brevemente per raccogliere il contenuto 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. Lasciare scongelare la miscela della reazione di controllo (CTRL), l’acqua priva di nucleasi per il controllo senza template (NTC) e il controllo positivo (PC) EGFR a temperatura ambiente (15-25°C) per minimo 1 ora e massimo 4,5 ore.
- I tempi per lo scongelamento dei reagenti, l’allestimento della PCR e la conservazione prima dell’avvio della seduta sono indicati in Tabella 2.

Tabella 2. Tempi di scongelamento, tempi di allestimento della PCR e temperature di conservazione

Tempo minimo di scongelamento	Tempo massimo di scongelamento	Temperatura di conservazione dopo allestimento PCR	Tempi massimi per allestimento PCR e conservazione
1 ore	4,5 ore	Temperatura ambiente (15-25°C)	6 ore
1 ore	4,5 ore	2-8°C	18 ore

Nota: l’allestimento della PCR viene eseguito a temperatura ambiente (15-25°C). Il termine “conservazione” si riferisce al tempo compreso tra il completamento dell’allestimento PCR e l’inizio della seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.

Nota: portare la *Taq* a temperatura ambiente (15-25°C) contemporaneamente agli altri reagenti (vedere “Conservazione e manipolazione dei reagenti”, a pagina 19). Centrifugare brevemente la provetta affinché l’enzima si depositi sul fondo.

2. 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.
3. Preparare una quantità di Master Mix di controllo (miscela della reazione di controllo [CTRL] più *Taq*) sufficiente per i campioni di DNA, una reazione EGFR PC e una reazione NTC facendo riferimento ai volumi indicati nella Tabella 3. Includere i reagenti per un campione extra, in modo da avere a disposizione un’eccedenza per l’allestimento della PCR.
- La miscela Master Mix contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Tabella 3. Preparazione della miscela Master Mix per il saggio di controllo

Componente	Volume
Miscela reazione di controllo (CTRL)	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Taq DNA polimerasi (Taq)	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Volume totale	20 μl/reazione

* n = numero di reazioni (campioni più controlli). Preparare la soluzione Master Mix in quantità sufficiente per un campione extra (n + 1), in modo da avere a disposizione un'eccedenza per l'allestimento della PCR. Il valore n non deve essere maggiore di 26 (24 campioni più 2 controlli).

Nota: durante la preparazione della soluzione Master Mix, prima viene aggiunta nella provetta la miscela della reazione di controllo e, per ultima, viene aggiunta la Taq.

4. Miscelare con cura la miscela Master Mix pipettando su e giù per 10 volte delicatamente. Caricare il numero necessario di strisce di provette sul blocco di caricamento in base all'esatta disposizione nella Tabella 4. Aggiungere immediatamente 20 μl di Master Mix in ogni provetta della striscia per PCR.

I tappi resteranno nel contenitore di plastica per il tempo necessario. Per la valutazione del campione di DNA, la soluzione Master Mix del saggio di controllo viene aggiunta in una provetta PC, una provetta NTC e una provetta per ogni campione.

Tabella 4. Disposizione dei saggi di valutazione dei campioni di DNA nel blocco di caricamento. I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.

Saggio	Posizione								
Controllo	1[PC]	9	17	25	–	–	–	–	–
Controllo	2[NTC]	10	18	26	–	–	–	–	–
Controllo	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Controllo	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Controllo	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Controllo	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Controllo	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Controllo	8	16	24	–	–	–	–	–	–

5. Aggiungere immediatamente 5 µl di acqua per NTC nella provetta nella posizione 2 e chiudere con il tappo.
6. Aggiungere 5 µl di ogni campione nelle provette per campioni (posizioni provette 3-26) e chiudere con i tappi.
7. Aggiungere 5 µl di EGFR PC nella provetta nella posizione 1 e chiudere con il tappo.
Evitare errori di caricamento o pipettamento per aggiungere volumi corretti di NTC, campioni e PC nelle provette opportune. Contrassegnare i tappi delle provette in modo da segnalare la direzione di caricamento delle provette sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.
8. Dopo aver tappato tutte le provette per PCR, controllare visivamente i livelli di riempimento per verificare che tutte le provette contengano campioni.
9. Capovolgere le provette per PCR quattro volte per miscelare i campioni e le miscele delle reazioni.
10. Inserire le strisce di provette per PCR nelle posizioni appropriate del rotore a 72 pozzetti, come indicato in Tabella 4.
Se il rotore non è completamente occupato, inserire una provetta con tappo vuota in ogni posizione vuota del rotore.

11. Caricare immediatamente il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q MDx. Assicurarsi che l'anello bloccante (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q MDx) sia montato esattamente sopra al rotore, in modo che le provette restino ferme durante la seduta.
- Nota:** se i campioni verranno valutati manualmente, vedere "Appendice A: protocollo del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per la procedura manuale" a pagina 75.
12. Avviare il software Rotor-Gene Q facendo doppio clic sull'icona "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template", sul desktop del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx (Figura 1).



Figura 1. Icona EGFR CE Locked Template per la seduta di controllo (valutazione dei campioni).

13. La scheda "Setup" (Configurazione) viene visualizzata per impostazione predefinita (Figura 2). Verificare che l'anello bloccante sia posizionato correttamente e selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato). Chiudere il coperchio dello strumento Rotor-Gene Q MDx.

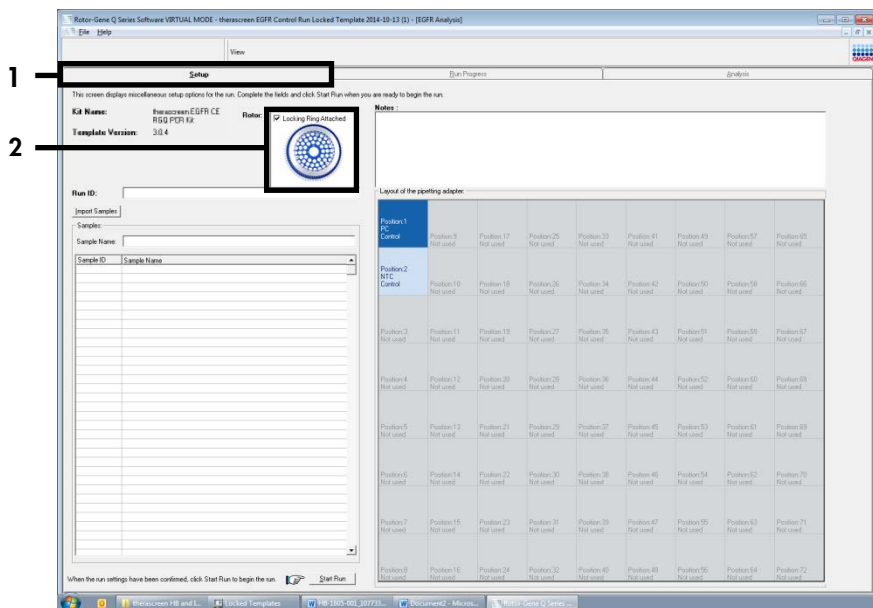


Figura 2. La scheda "Setup" (Configurazione) (1) e la casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato) (2).

14. Immettere l'ID della seduta nel campo "Run ID" (ID seduta) in base alle convenzioni di denominazione locali. Immettere il nome del campione nel campo "Sample Name" (Nome campione) in base alle convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto Invio.

Il nome del campione viene aggiunto all'elenco dei campioni in basso e al campione viene assegnato un "Sample ID" (ID campione) del tipo 1, 2, 3 e così via. Inoltre il riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) sul lato destro viene aggiornato per includere il nome del campione (Figura 3).

Nota: in alternativa, è possibile importare i campioni salvati in formato *.smp (file campione Rotor-Gene Q) o *.csv (valori separati da virgola) utilizzando la funzione "Import Samples" (Importa campioni). Questo metodo consente di popolare automaticamente i nomi dei campioni.

Nota: nel riquadro “Layout of the pipetting adapter” (Configurazione dell’adattatore di pipettamento) verificare che il nome del campione appena aggiunto sia evidenziato da un cambio di colore e che il nome del campione compaia nella posizione assegnata al campione (Figura 3).

Nota: i campioni i cui nomi sono composti da più di otto caratteri potrebbero non essere visualizzati per intero nel riquadro “Layout of the pipetting adapter” (Configurazione dell’adattatore di pipettamento).

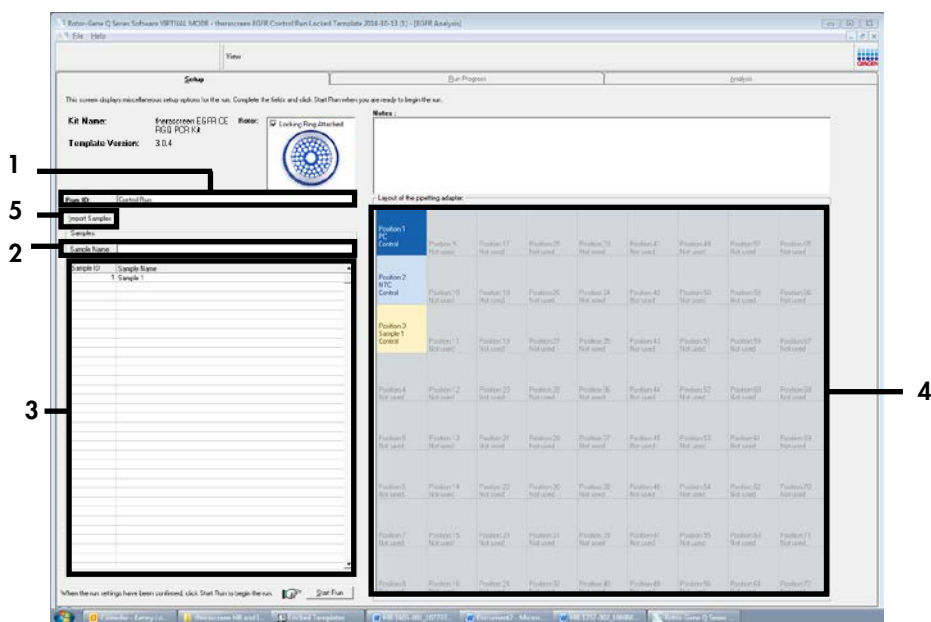


Figura 3. Immissione di ID della seduta e nome del campione nei campi appropriati. 1 = campo “Run ID” (ID seduta); 2 = campo “Sample Name” (Nome campione); 3 = elenco campioni; 4 = riquadro “Layout of the pipetting adaptor” (Configurazione dell’adattatore di pipettamento); 5 = riquadro “Sample Import” (Importazione campioni).

15. Ripetere il passaggio 14 per immettere i nomi di tutti gli altri campioni (Figura 4).

Nota: per modificare il nome di un campione, fare clic su di esso nell'elenco dei campioni; il nome del campione selezionato verrà visualizzato nel campo "Sample Name" (Nome campione), appena sopra l'elenco. Modificare il nome del campione rispettando le convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto Invio per rendere effettiva la modifica.

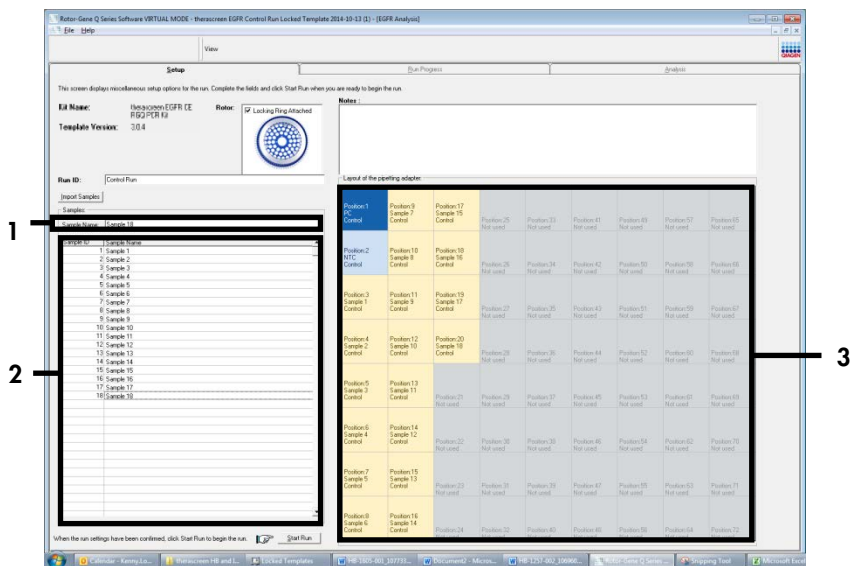


Figura 4. Immissione di altri nomi di campioni nel campo appropriato. 1 = campo "Sample Name" (Nome campione); 2 = elenco campioni, 3 = riquadro "Layout of the pipetting adaptor" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento).

16. Dopo aver immesso i nomi di tutti i campioni, verificare che siano corretti. Se necessario, aggiungere ulteriori informazioni nel campo "Notes" (Annotazioni) e fare clic su "Start Run" (Avvia seduta) (Figura 5).

Nota: se qualche posizione del rotore è inutilizzata, viene visualizzato un "Warning" (Avvertenza) (Figura 5) per ricordare all'utente che è necessario occupare tutte le posizioni del rotore, eventualmente con provette vuote tappate. Assicurarsi che tutte le posizioni del rotore prima inutilizzate siano ora occupate da provette vuote tappate, quindi fare clic su "OK" per proseguire.

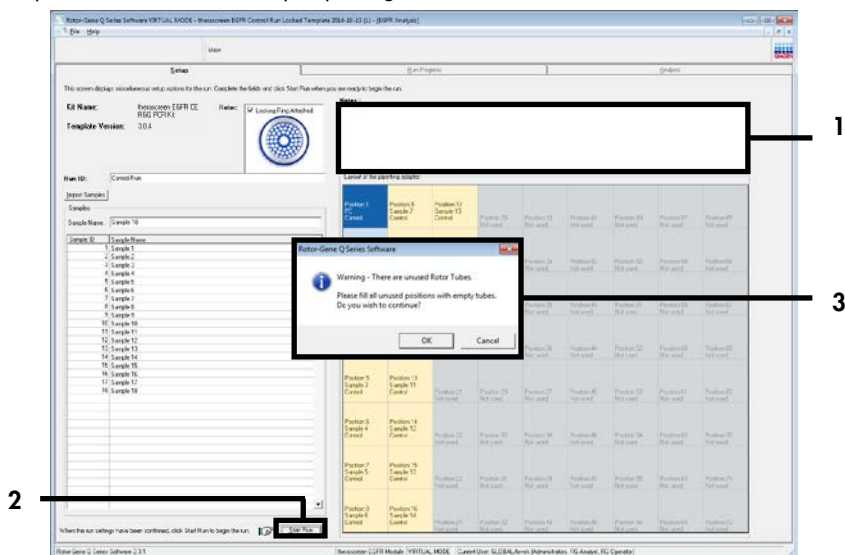


Figura 5. Campo riservato alle annotazioni (1), pulsante "Start Run" (Avvio seduta) (2) e avvertenza relativa alle posizioni del rotore inutilizzate (3).

17. Viene visualizzata la finestra "Save As" (Salva con nome). Scegliere un nome file adeguato e salvare la seduta PCR con l'estensione *.rex nel percorso selezionato. Fare clic su "Save" (Salva) (Figura 6).

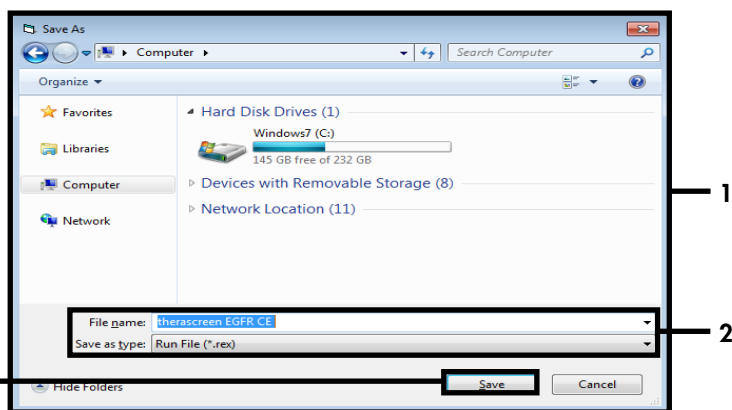


Figura 6. Finestra "Save As" (Salva con nome) (1). 2 = campi "File Name" (Nome file) e "Save as type" (Salva come);
3 = "Save" (Salva).

18. La seduta PCR viene avviata.

Nota: quando la seduta ha inizio, si apre la scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta) per mostrare il tracciato della temperatura e il tempo rimanente per la seduta (Figura 7).

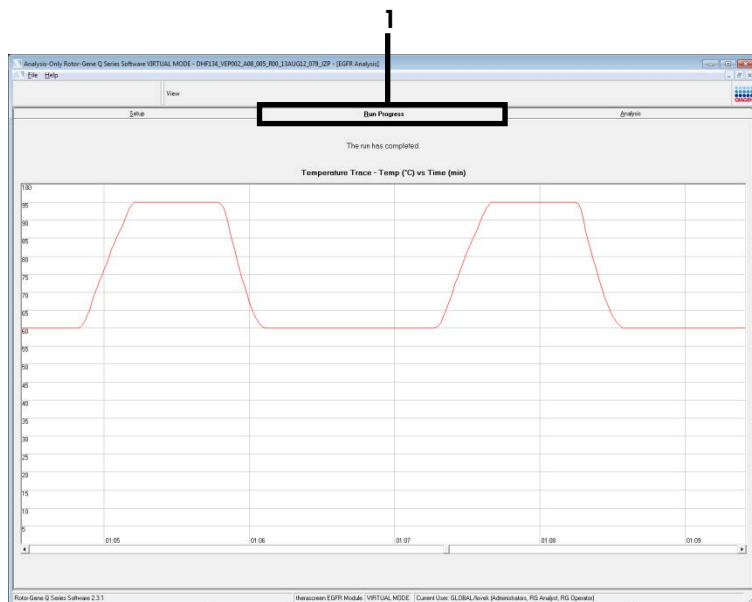


Figura 7. Scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta) (1).

19. Quando la seduta si conclude, viene visualizzata la scheda "Analysis" (Analisi).

Nota: se ciò non avviene automaticamente, fare clic sulla scheda "Analysis" (Analisi) (Figura 8).

Nota: per una spiegazione del metodo di calcolo, fare riferimento al paragrafo "Interpretazione dei risultati (automatica)" a pagina 49.

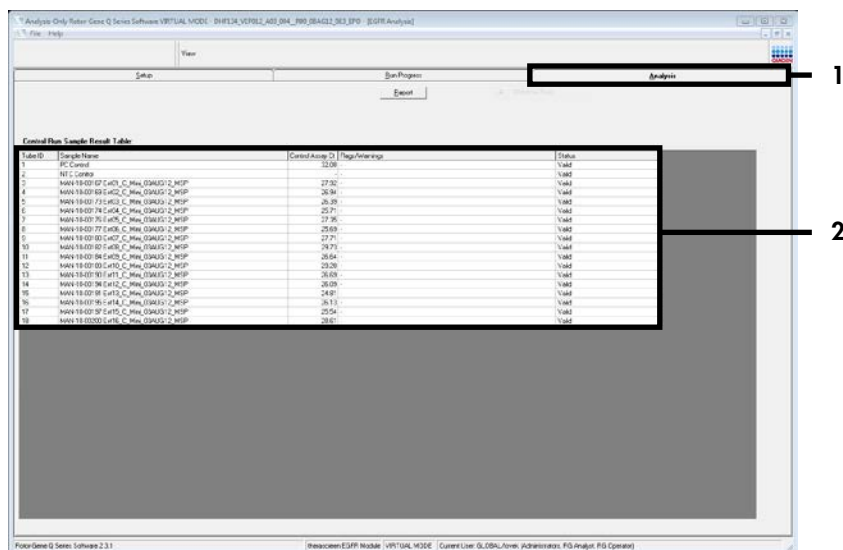


Figura 8. La scheda "Analysis" (Analisi) (1) e i risultati riportati (2 = "Sample QC Result Table" (Tabella risultati QC campioni)).

20. I risultati dei controlli vengono riportati nel modo seguente nella tabella denominata "Sample QC Result Table" (Tabella risultati QC campioni) (Figura 8).

Controlli della seduta (PC e NTC, rispettivamente posizioni 1 e 2 delle provette). Se i risultati rientrano nei range accettabili, vengono elencati singolarmente con "Valid" (Valido). In caso contrario il risultato è "Invalid" (Non valido).

Se il valore C_T della reazione di controllo del campione è $> 31,10$, il risultato è "Invalid" (Non valido). La quantità di DNA è insufficiente per l'analisi mutazionale. Ripetere il test sul campione. Se la quantità di DNA è ancora insufficiente, estrarre altro tessuto tumorale, se disponibile.

Se il valore C_T della reazione di controllo del campione è $> 23,70$, il risultato è "Invalid" (Non valido). La concentrazione del DNA è troppo alta per l'analisi mutazionale. Diluire con acqua priva di nucleasi per diluizione (Dil.) e ripetere il test. Diluire fino a un valore C_T di 23,70-31,10. Una diluizione 1:1 aumenta il valore C_T di circa 1,0.

Se il valore C_T della reazione di controllo del campione è compreso tra 23,70 e 31,10, ($23,70 \leq C_T \text{ controllo} \leq 31,00$), il risultato è “Valid” (Valido). La concentrazione del DNA è idonea all’analisi mutazionale.

Nota: se è necessario ripetere l’estrazione o diluire il campione, ripetere la reazione di controllo per confermare che la concentrazione del DNA è idonea all’uso.

21. Fare clic su “Report” per generare un file di report. Viene visualizzata la finestra “Report Browser” (Browser dei report). Selezionare “EGFR CE Analysis Report” (Report analisi EGFR CE) sotto “Templates” (Modelli), quindi fare clic su “Show” (Mostra) (Figura 9).

Nota: per salvare i report in un percorso alternativo, nel formato webarchive, fare clic su “Save As” (Salva con nome) nell’angolo in alto a sinistra di ogni report.

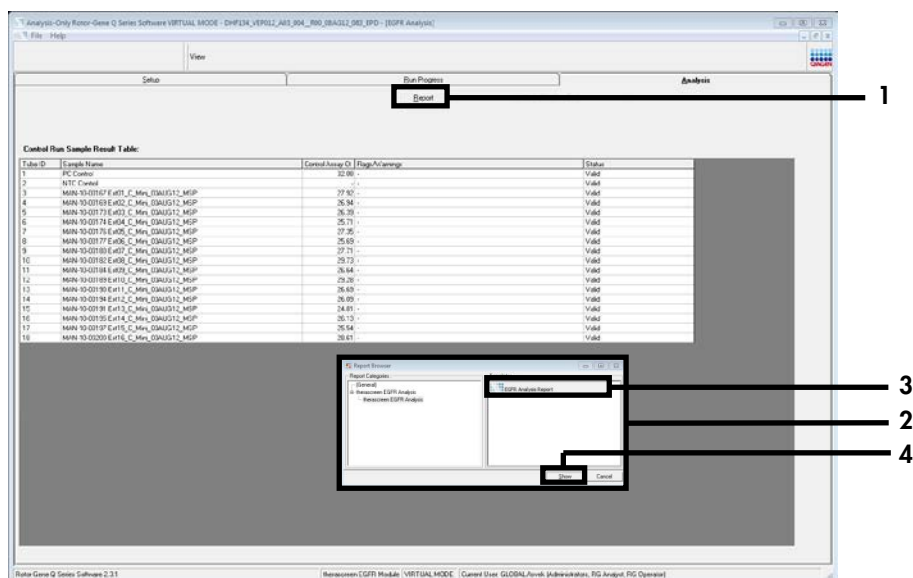


Figura 9. Selezione del report dell’analisi EGFR CE. 1 = “Report”; 2 = finestra “Report Browser” (Browser dei report); 3 = “EGFR Analysis Report” (Report di analisi EGFR); 4 = “Show” (Mostra).

Protocollo: rilevazione delle mutazioni EGFR

Questo protocollo consente di rilevare le mutazioni EGFR. Quando un campione di DNA supera la valutazione, può essere analizzato con i saggi di mutazione EGFR utilizzando il software automatizzato.

Nota: per la valutazione manuale della mutazione, vedere “Appendice A: protocollo del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per la procedura manuale” a pagina 75.

Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Prima di avviare la procedura, leggere “Precauzioni generali”, pag. 17.
- Acquisire esperienza con l’uso dello strumento Rotor-Gene Q MDx prima di avviare il protocollo. Fare riferimento al manuale utente dello strumento.
- È possibile eseguire i saggi di mutazione EGFR solo dopo che il campione di DNA ha superato la valutazione.
- Per un uso efficiente del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, è necessario raggruppare i campioni in batch di sette. Se si utilizzano batch più piccoli, il numero di campioni che è possibile analizzare con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR diminuisce.
- Ogni campione deve essere analizzato con tutte le miscele delle reazioni fornite nel kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Non agitare in vortex la *Taq* o qualsiasi miscela contenente *Taq*, in quanto l’enzima potrebbe inattivarsi.
- Pipettare la *Taq* inserendo accuratamente 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 utilizzare lo strumento Rotor-Gene Q MDx, assicurarsi che il software *therascreen* EGFR CE Assay Package sia installato (vedere “Appendice B: installazione del software *therascreen* EGFR CE Assay Package” a pagina 104).

- Prima di ogni uso, è necessario lasciare scongelare completamente tutti i reagenti per almeno 1 ora a temperatura ambiente (15-25°C) ma senza superare 4,5 ore, quindi miscelare capovolgendo per 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta.
- Miscelare tutti i campioni capovolgendo 10 volte e centrifugando brevemente per raccogliere il contenuto 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 tutte le provette della miscela della reazione di controllo, l'acqua per il controllo senza template (NTC) e il controllo positivo EGFR PC a temperatura ambiente (15-25°C) per minimo 1 ora e massimo 4,5 ore.

I tempi per lo scongelamento dei reagenti, l'allestimento della PCR e la conservazione prima dell'avvio della seduta sono indicati in Tabella 5.

Tabella 5. Tempi di scongelamento, tempi di allestimento della PCR e temperature di conservazione

Tempo minimo di scongelamento	Tempo massimo di scongelamento	Temperatura di conservazione dopo allestimento PCR	Tempi massimi per allestimento PCR e conservazione
1 ore	4,5 ore	Temperatura ambiente (15-25°C)	6 ore
1 ore	4,5 ore	2-8°C	18 ore

Nota: l'allestimento della PCR viene eseguito a temperatura ambiente (15-25°C).

Il termine "conservazione" si riferisce al tempo compreso tra il completamento dell'allestimento PCR e l'inizio della seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.

Nota: portare la *Taq* (provetta *Taq*) a temperatura ambiente (15-25°C) contemporaneamente agli altri reagenti (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti" a pagina 19). Centrifugare brevemente la provetta affinché l'enzima si depositi sul fondo.

2. 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.
3. Preparare soluzioni Master Mix del saggio (miscela della reazione del saggio più Taq) sufficienti per i campioni di DNA, una reazione EGFR PC e una reazione NTC facendo riferimento ai volumi indicati nella Tabella 6. Includere i reagenti per un campione extra, in modo da avere a disposizione un'eccedenza per l'allestimento della PCR.

Le soluzioni Master Mix contengono tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

Tabella 6. Preparazione delle soluzioni Master Mix per i saggi

Saggio	Provetta con la miscela di reazione	Volume della miscela di reazione	Volume di Taq DNA polimerasi (provetta Taq)
Controllo	CTRL	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)^*$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)^*$
T790M	T790M	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
Delezioni	Del	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
L858R	L85R	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
L861Q	L861Q	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
G719X	G719X	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
S768I	S768I	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$
Inserzioni	Ins	$19,5 \mu\text{l} \times (n+1)$	$0,5 \mu\text{l} \times (n+1)$

* n = numero di reazioni (campioni più controlli). Preparare la soluzione Master Mix in quantità sufficiente per un campione extra (n + 1), in modo da avere a disposizione un'eccedenza per l'allestimento della PCR. Il valore n non deve superare sette (più i controlli), in quanto sette è il numero massimo di campioni che possono essere inclusi in una seduta.

4. Miscelare con cura le soluzioni Master Mix del saggio pipettando su e giù per 10 volte delicatamente. Caricare il numero necessario di strisce di provette sul blocco di caricamento in base all'esatta disposizione nella Tabella 7. Aggiungere immediatamente 20 μl della soluzione Master Mix del saggio appropriata in ogni provetta della striscia per PCR.

I tappi resteranno nel contenitore di plastica per il tempo necessario.

Tabella 7. Disposizione dei saggi delle mutazioni e dei controlli nel blocco di caricamento. I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.

Saggio	Controlli		Posizione						
	PC	NTC	Numero campione						
			1	2	3	4	5	6	7
Controllo	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. Aggiungere immediatamente 5 µl di acqua per NTC nelle provette nelle posizioni 9-16 e chiudere con il tappo.
6. Aggiungere 5 µl di ogni campione nelle provette per campioni (posizioni provette 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64 e 65-72) e chiudere con il tappo.
7. Aggiungere 5 µl di EGFR PC nella provetta nella posizione 1-8 e chiudere con il tappo.
- Evitare errori di caricamento o pipettamento per aggiungere volumi corretti di NTC, campioni ed EGFR PC nelle provette opportune.
- Ogni provetta dovrebbe contenere un volume della reazione totale pari a 25 µl (20 µl di Master Mix del saggio preparati al passaggio 3 (Tabella 6), più 5 µl di NTC/campione/PC). I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.
- Contrassegnare i tappi delle provette in modo da segnalare la direzione di caricamento delle provette sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.
8. Dopo aver tappato tutte le provette per PCR, controllare visivamente i livelli di riempimento per verificare che tutte le provette contengano campioni.

9. Capovolgere le provette per PCR quattro volte per miscelare i campioni e le miscele delle reazioni.
10. Inserire le strisce di provette per PCR nelle posizioni appropriate del rotore a 72 pozzetti, come indicato in Tabella 7.
- È possibile includere al massimo sette campioni in ogni seduta PCR. Se il rotore non è completamente occupato, inserire una provetta con tappo vuota in ogni posizione vuota del rotore.
11. Caricare immediatamente il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q MDx. Assicurarsi che l'anello bloccante (accessorio dello strumento Rotor-Gene Q MDx) sia montato esattamente sopra al rotore, in modo che le provette restino ferme durante la seduta.
- Nota:** se la mutazione EGFR verrà rilevata manualmente, vedere "Appendice A: protocollo del kit *therascreen* KRAS RGQ PCR per la procedura manuale", pagina 76.
12. Avviare il software Rotor-Gene Q facendo doppio clic sull'icona "*therascreen* EGFR CE Locked Template", sul desktop del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx (Figura 10).



Figura 10. Icona EGFR CE Locked Template (rilevazione della mutazione EGFR).

13. La scheda "Setup" (Configurazione) viene visualizzata per impostazione predefinita (Figura 11). Verificare che l'anello bloccante sia posizionato correttamente e selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato). Chiudere il coperchio dello strumento Rotor-Gene Q MDx.

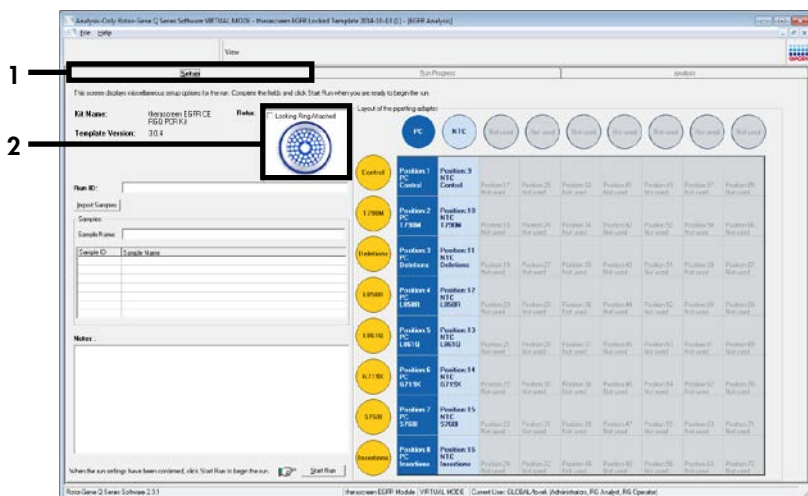


Figura 11. La scheda "Setup" (Configurazione) (1) e la casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato) (2).

14. Immettere l'ID della seduta nel campo "Run ID" (ID seduta) in base alle convenzioni di denominazione locali. Immettere il nome del campione nel campo "Sample Name" (Nome campione) in base alle convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto Invio. Il nome del campione viene aggiunto all'elenco dei campioni in basso e al campione viene assegnato un "Sample ID" (ID campione) del tipo 1, 2, 3 e così via. Inoltre il riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) sul lato destro viene aggiornato per includere il nome del campione (Figura 12).

Nota: in alternativa, è possibile importare i campioni salvati in formato *.smp (file campione Rotor-Gene Q) o *.csv (valori separati da virgola) utilizzando il pulsante "Import Samples" (Importa campioni). Questo metodo consente di popolare automaticamente i nomi dei campioni.

Nota: nel riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) verificare che il nome del campione appena aggiunto sia evidenziato da un cambio di colore e che il nome del campione compaia nella posizione assegnata al campione (Figura 12).

Nota: è possibile aggiungere sette campioni al massimo. Gli ID dei campioni (nei cerchi) vengono assegnati automaticamente dall'1 al 7.

Nota: i campioni i cui nomi sono composti da più di otto caratteri potrebbero non essere visualizzati per intero nel riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento).

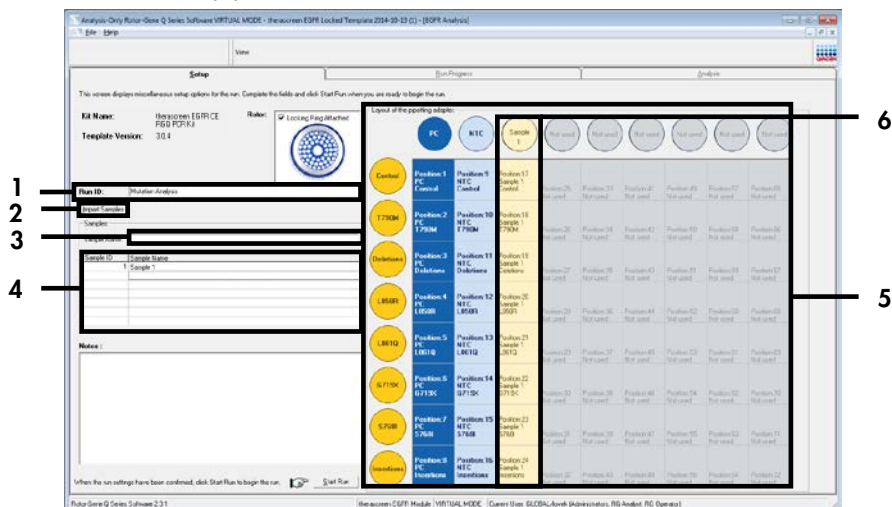


Figura 12. Immissione di ID della seduta e nome del campione nei campi appropriati. 1 = campo "Run ID" (ID seduta); 2 = pulsante "Import Samples" (Importa campioni); 3 = campo "Sample Name" (Nome campione); 4 = elenco campioni; 5 = riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento); 6 = cerchio del campione evidenziato e colonna con 8 saggi nel riquadro sottostante.

15. Ripetere il passaggio 14 per immettere i nomi di tutti gli altri campioni (Figura 13).

Nota: per modificare il nome di un campione, fare clic su di esso nell'elenco dei campioni; il nome del campione selezionato viene visualizzato nel campo "Sample Name" (Nome campione), appena sopra l'elenco. Modificare il nome del campione rispettando le convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto Invio per rendere effettiva la modifica.

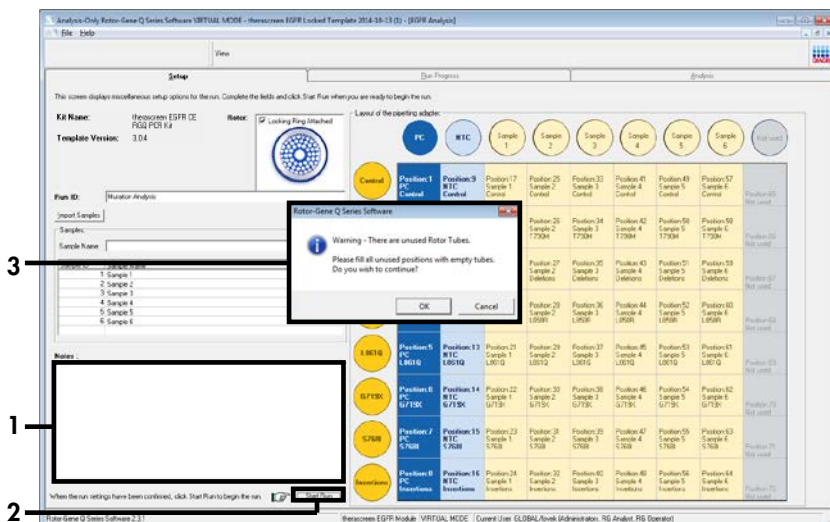


Figura 14. Campo riservato alle annotazioni (1), pulsante di avvio della seduta (2) e avvertenza relativa alle posizioni del rotore inutilizzate (3).

17. Viene visualizzata la finestra "Save As" (Salva con nome). Scegliere un nome file adeguato e salvare la seduta PCR con l'estensione *.rex nel percorso selezionato. Fare clic su "Save" (Salva) (Figura 15).

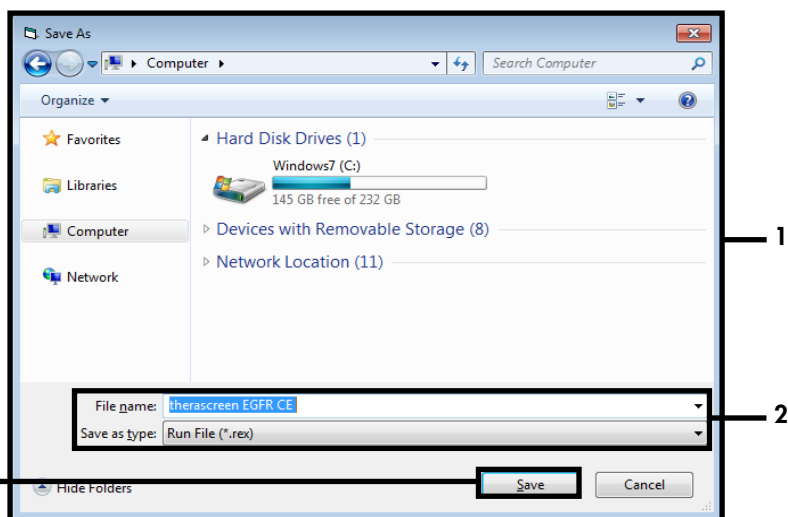


Figura 15. Finestra “Save As” (Salva con nome) (1). 2 = campi “File Name” (Nome file) e “Save as type” (Salva come); 3 = “Save” (Salva).

18. La seduta PCR viene avviata.

Nota: quando la seduta ha inizio, si apre la scheda “Run Progress” (Avanzamento seduta) per mostrare il tracciato della temperatura e il tempo rimanente per la seduta (Figura 16).

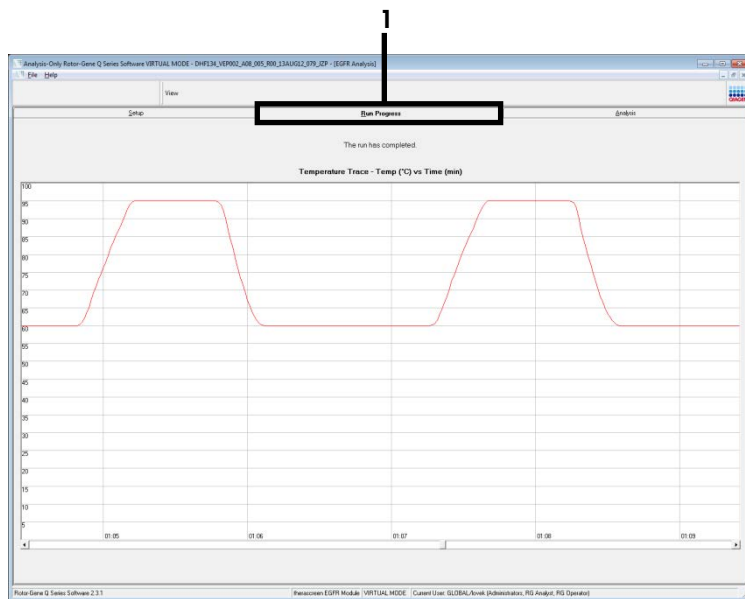


Figura 16. Scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta).

19. Quando la seduta si conclude, viene visualizzata la scheda "Analysis" (Analisi).

Nota: se ciò non avviene automaticamente, fare clic sulla scheda "Analysis" (Analisi) (Figura 17).

Nota: per una spiegazione del metodo di calcolo, fare riferimento al paragrafo "Interpretazione dei risultati (automatica)" a pagina 49.

Figure 17 shows the 'Analysis' tab of the software. It contains three main data sections:

- Run Controls, Positive Control (2):** A table with columns: Probe Position, Assay, Flag/Settings, and Positive Control Status. It lists control probes like T790M, Deletion, L858R, and S708, all with 'Valid' status.
- Run Controls, Negative Control (3):** A table with columns: Probe Position, Assay, NTC, Internal Control, Flag/Settings, and Negative Control Status. It lists control probes like T790M, Deletion, L858R, and S708, all with 'Valid' status.
- Sample Result Table (4):** A table with columns: Sample ID, Sample Name, EGFR Status, Control ID, Delta Ct, Flag/Settings, and EGFR Mutation Status. It lists 7 samples, all with 'Mutation Detected' status. The 'EGFR Mutation Status' column (5) lists specific mutations: L858R, T790M, L858R, L858R, L858R, L858R, and L858R.

Figura 17. La scheda “Analysis” (Analisi) (1) e i risultati riportati. 2 = riquadro “Run Controls, Positive Control” (Controlli seduta, Controllo positivo); 3 = riquadro “Run Controls, Negative Control” (Controlli seduta, Controllo negativo); 4 = riquadro “Sample Result Table” (Tabella risultati campioni); 5 = riquadro “Mutation Status” (Stato mutazione).

20. I risultati dei saggi vengono comunicati nel modo seguente (Figura 18):

Run Controls, Positive Control (Controlli seduta, Controllo positivo): Se i risultati rientrano nei limiti di accettabilità, nel campo “Positive Control Status” (Stato controllo positivo) comparirà “Valid” (Valido), in caso contrario comparirà “Invalid” (Non valido).

Run Controls, Negative Control (Controlli seduta, Controllo negativo): Se entrambi i risultati “NTC” (Controllo senza template) e “Internal Control” (Controllo interno) rientrano nei limiti di accettabilità, nel campo “Negative Control Status” (Stato controllo negativo) comparirà “Valid” (Valido), in caso contrario comparirà “Invalid” (Non valido).

Sample Result Table (Tabella risultati campioni): Le specifiche mutazioni rilevate nei campioni positivi vengono indicate nella colonna “EGFR Mutation Status” (Stato mutazione EGFR).

21. Fare clic su “Report” per generare un file di report. Viene visualizzata la finestra “Report Browser” (Browser dei report). Selezionare “EGFR CE Analysis Report” (Report analisi EGFR CE) sotto “Templates” (Modelli), quindi fare clic su “Show” (Mostra) (Figura 18).

Nota: per salvare un report in un percorso alternativo, nel formato webarchive, fare clic su “Save As” (Salva con nome) nell’angolo in alto a sinistra di ogni report.

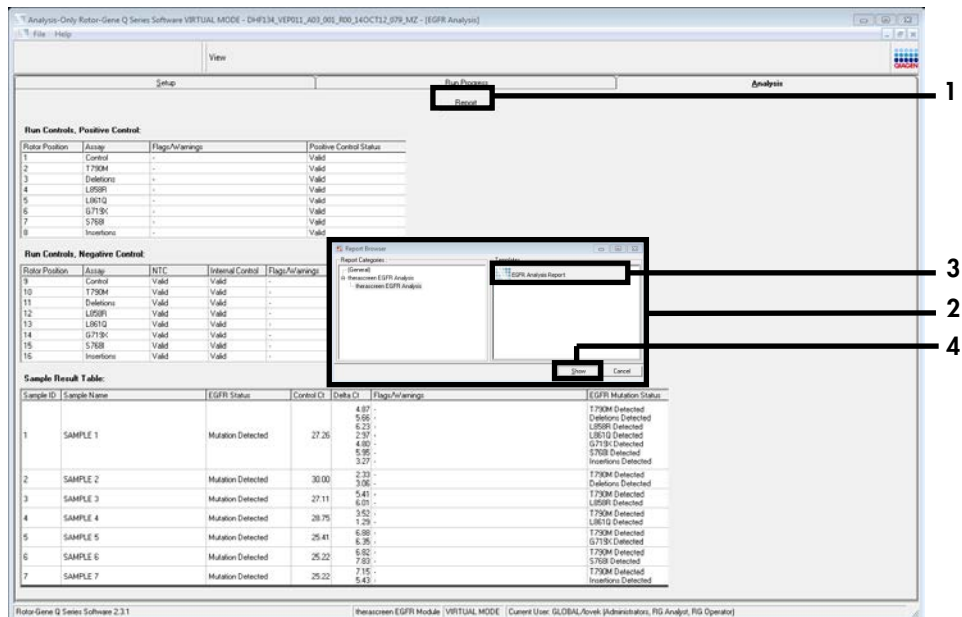


Figura 18. Selezione del report dell’analisi EGFR CE. 1 = “Report”; 2 = riquadro “Report Browser” (Browser dei report); 3 = “EGFR Analysis Report” (Report di analisi EGFR); 4 = “Show” (Mostra).

Interpretazione dei risultati (automatica)

L'analisi e la classificazione delle mutazioni vengono eseguite automaticamente dal software *therascreen* EGFR Assay Package al termine di una seduta. Le informazioni che seguono spiegano il modo in cui il software *therascreen* EGFR Assay Package esegue l'analisi e assegna le mutazioni.

Nota: per l'analisi manuale dei risultati, vedere "Interpretazione dei risultati (manuale)" a pagina 92.

Il ciclo della PCR nel quale la fluorescenza proveniente da una particolare reazione supera un valore soglia viene definito come valore C_T . I valori C_T indicano la quantità di DNA iniziale specifico. Valori C_T bassi indicano livelli di DNA iniziale alti, mentre valori C_T alti indicano livelli di DNA iniziale bassi. Le reazioni che hanno un valore C_T sono classificate come amplificazioni positive.

Il software Rotor-Gene Q esegue l'interpolazione dei segnali di fluorescenza tra una coppia qualsiasi di valori registrati. Di conseguenza i valori C_T possono essere un qualsiasi numero reale (non limitato agli interi) compreso nell'intervallo tra 0 e 40. Per il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, il valore soglia per il canale verde (FAM) è impostato a 0,075 unità di fluorescenza relative e per il canale giallo (HEX) a 0,02. Questi valori vengono configurati automaticamente nel *therascreen* EGFR Assay Package. I controlli della seduta (PC, NTC e IC) vengono valutati per assicurare che siano rispettati i valori C_T accettabili e che le reazioni siano avvenute in modo corretto.

I valori ΔC_T dei campioni vengono calcolati per ciascun saggio di mutazione applicando l'equazione:

$$\Delta C_T = [\text{valore } C_T \text{ del saggio di mutazione}] - [\text{valore } C_T \text{ del saggio di controllo}]$$

I campioni sono classificati come positivi alla mutazione se restituiscono un valore ΔC_T minore o uguale al valore ΔC_T di cut-off per il saggio. Al di sopra di questo valore, infatti, il campione potrebbe contenere una mutazione percentualmente inferiore al limite di sensibilità del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR oppure potrebbe essere negativo alla mutazione e quindi classificato come "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata).

In assenza di amplificazione nelle reazioni delle mutazioni, il campione viene classificato come "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata). I valori ΔC_T calcolati dall'amplificazione sul fondo dovrebbero essere maggiori dei valori ΔC_T di cut-off e il campione viene classificato come "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata).

I risultati dei saggi possono essere "Mutation Detected" (Mutazione rilevata), "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata), "Invalid" (Non valido) o, se un controllo della seduta ha esito negativo, "Run Control Failed" (Controllo seduta fallito). Nel caso di campioni positivi alle mutazioni, verranno indicate le specifiche mutazioni. Un tumore può contenere più di una mutazione. In tali circostanze viene riportata più di una mutazione.

Avvisi del software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package

La Tabella 8 (pagina successiva) elenca gli avvisi che potrebbero essere generati dal software Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, il loro significato e le azioni da intraprendere.

I nomi degli avvisi sono costruiti in modo da fornire informazioni sul componente del kit, sul campione o sul controllo interessato dal problema e sul tipo di errore.

Ad esempio:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = Controllo positivo (PC), Saggio di controllo (CTRL_ASSAY) è fallito (FAIL)
 - NTC_INT_CTRL_FAIL = Controllo senza template (NTC), Controllo interno (INT_CTRL) è fallito (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = Campione (SAMPLE), Saggio di controllo (CTRL) ha un'alta concentrazione (HIGH_CONC).

Tabella 8. Avvisi, significato e contromisure

Flag	Significato	Intervento
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Seduta PCR non valida: valore C_T FAM fuori intervallo per il controllo positivo nella reazione di controllo.	Ripetere l'intera seduta PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Seduta PCR non valida: valore C_T FAM fuori intervallo per una o più reazioni di controllo delle mutazioni.	Ripetere l'intera seduta PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Seduta PCR non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo positivo (miscela reazione di controllo).	Ripetere l'intera seduta PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Seduta PCR non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo positivo (miscela reazione di mutazione).	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Seduta PCR non valida: controllo interno al di sopra dell'intervallo per il controllo negativo.	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Seduta PCR non valida: controllo interno al di sotto dell'intervallo per il controllo negativo.	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INVALID_CT	Seduta PCR non valida: valore FAM non valido (inferiore al limite) per il controllo negativo.	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INVALID_DATA	Seduta PCR non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo negativo.	Ripetere l'intera seduta PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Campione non valido: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo del campione.	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere il test sul campione o sui campioni interessati.

Flag	Significato	Intervento
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Campione non valido: valore C _T FAM troppo basso nel controllo del campione.	Diluire il campione per aumentare il valore C _T del controllo. La diluizione dovrebbe essere calcolata sulla base del dato che, diluendo 1:1 con l'acqua contenuta nel kit, il valore C _T aumenterà di 1,0. Dopo aver diluito il campione, allestire una nuova seduta di valutazione delle mutazioni per ripetere l'analisi. Se invece il campione è stato diluito secondo i criteri della seduta di valutazione del campione di DNA, procedere direttamente con la seduta di rilevazione della mutazione EGFR con il campione diluito.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Campione non valido: valore C _T FAM troppo alto nella reazione di controllo del campione.	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido per il campione, e la quantità di DNA è ancora insufficiente, estrarre altre due sezioni di tessuto FFPE eventualmente disponibili. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test su questa nuova estrazione. Se il campione genera un risultato non valido, ripetere la seduta PCR sulla seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.

Flag	Significato	Intervento
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valore CT troppo alto (o C _T non disponibile) per il controllo interno (HEX), negativo alla mutazione nel canale FAM.	<p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con una mutazione rilevata (o non rilevata) in una miscela di reazione clinicamente rilevante, generare un report dei risultati senza eseguire ulteriori test.</p> <p>Diluire il campione con l'acqua contenuta nel kit tenendo conto che, diluendo 1:1, il valore C_T della reazione di controllo aumenterà di 1,0. Fare in modo che il volume finale sia > 40 µl (ad esempio, 40 µl di DNA e 40 µl di acqua dalla provetta DIL).</p> <p>Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da altre due sezioni FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test su questa nuova estrazione.</p> <p>Se la seconda estrazione genera un risultato non valido, diluire nel modo descritto in precedenza.</p> <p>Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Provetta mutazione non valida: valore C _T HEX troppo basso per il campione (controllo interno).	<p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con una mutazione rilevata (o non rilevata) in una miscela di reazione clinicamente rilevante, generare un report dei risultati senza eseguire ulteriori test.</p> <p>Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre altre due sezioni di tessuto FFPE se disponibile. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test su questa nuova estrazione. Se viene generato un risultato non valido, ripetere la seduta PCR sulla seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>

Flag	Significato	Intervento
SAMPLE_INVALID_DATA	Provetta mutazione non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo interno.	<p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con una mutazione rilevata (o non rilevata) in una miscela di reazione clinicamente rilevante, generare un report dei risultati senza eseguire ulteriori test.</p> <p>Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre altre due sezioni di tessuto FFPE se disponibile. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test su questa nuova estrazione. Se viene generato un risultato non valido, ripetere la seduta PCR sulla seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>

Flag	Significato	Intervento
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Ci sono una o più mutazioni positive per un campione; allo stesso tempo ci sono una o più mutazioni non valide per lo stesso campione.	<p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con una mutazione rilevata (o non rilevata) in una miscela di reazione clinicamente rilevante, generare un report dei risultati senza eseguire ulteriori test.</p> <p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con un risultato INVALID (non valido) ottenuto da una miscela di reazione clinicamente rilevante, ripetere il test sul campione con tutte le miscele di reazione dopo aver eseguito l'azione specifica descritta nell'avviso di non validità.</p> <p>Se viene generato un avviso SAMPLE_INT_CTRL_FAIL (controllo interno del campione fallito) contestualmente a un altro avviso per lo stesso campione, è necessario eseguire l'azione descritta nell'avviso SAMPLE_INT_CTRL_FAIL, ovvero la diluizione del campione interessato. Allestire una nuova seduta PCR per ripetere il test sul campione.</p> <p>Nel caso di campioni che generano un avviso SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (campione positivo e non valido) con un risultato INVALID (non valido) ottenuto da una miscela di reazione clinicamente rilevante durante la seduta PCR ripetuta, estrarre il campione da altre due sezioni FFPE. Allestire una nuova seduta PCR con tutte le miscele di reazione per eseguire il test su questa nuova estrazione.</p> <p>Se il campione genera di nuovo un risultato non valido per una miscela di reazione clinicamente rilevante, ripetere il test sul campione con tutte le miscele di reazione dopo aver eseguito l'azione specifica descritta nell'avviso di non validità. Se viene generato un avviso SAMPLE_INT_CTRL_FAIL (controllo interno del campione fallito) contestualmente a un altro avviso per lo stesso campione, è necessario eseguire l'azione descritta nell'avviso SAMPLE_INT_CTRL_FAIL, ovvero la diluizione del campione interessato. Allestire una nuova seduta PCR per ripetere il test su questo campione.</p> <p>Se viene generato l'avviso SAMPLE_POS_AND_INVALID (campione positivo e non valido) dopo la ripetizione, al campione viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato.</p>

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 servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

I campioni NTC generano risultati positivi nel canale FAM verde

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 decontaminati a intervalli regolari.

Nessun segnale con controllo positivo EGFR

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 non corretta del profilo delle temperature dello strumento RotorGene Q MDx.

Confrontare il profilo di temperature con il protocollo. Se non è corretto, ripetere la seduta.

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 corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pag. 19)

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 *therascreen* 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.

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 adeguatamente preparato e specializzato nelle procedure di diagnostica in vitro e nell'uso degli strumenti Rotor-Gene Q MDx.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso sul ciclatore per Real-time PCR Rotor-Gene Q MDx.

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 della reazione di controllo 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

Prestazioni analitiche

Le caratteristiche prestazionali specifiche del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono state determinate attraverso studi basati sull'uso di campioni di tessuto FFPE prelevati da pazienti NSCLC e da linee cellulari FFPE umane. Le linee cellulari FFPE sono state ottenute utilizzando una linea cellulare di carcinoma polmonare (A549) per produrre linee cellulari appartenenti alle specifiche mutazioni EGFR desiderate. Quando non erano disponibili né il campione di tessuto, né le linee cellulari, è stato utilizzato DNA plasmide.

Limite del bianco (LOB), intervallo valido e valori di cut-off

Per determinare il limite del bianco e i valori di cut-off per ogni saggio di mutazione, sono stati analizzati 417 campioni FFPE in uno studio conforme alle linee guida NCCLS EP17-A (2004) (12). È inoltre stato determinato l'intervallo di lavoro. Sono stati definiti i valori di cut-off riportati nella Tabella 9.

Tabella 9. Valori di cut-off definiti per ogni saggio di mutazione

Saggio	Cut-off (ΔCT)
T790M	$\leq 7,40$
Delezioni	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Inserzioni	$\leq 8,00$

L'intervallo C_T della reazione di controllo è stato fissato tra 23,70 e 31,10 C_T .

I valori di cut-off e gli intervalli validi del saggio sono stati verificati utilizzando gli standard e altri campioni FFPE. In fase di verifica è stato valutato se i valori di cut-off siano in grado di distinguere la mutazione corretta in un fondo di DNA wild-type: a questo scopo è stato valutato individualmente ogni saggio con una concentrazione di DNA genomico iniziale elevata e una concentrazione di DNA mutazionale iniziale elevata (vedere "Reattività crociata" a pagina 61). È stato inoltre valutato se il DNA iniziale può avere un impatto sulla classificazione di positività alla mutazione (vedere "Impatto del DNA iniziale sui valori ΔC_T " a pagina 60).

Per valutare le prestazioni del kit *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR in assenza di template e per verificare che un campione bianco o un campione con DNA wild-type non generino un segnale analitico che potrebbe indicare una mutazione con bassa concentrazione, sono stati valutati i campioni senza template e il DNA wild-type EGFR di NSCLC. Non vi sono stati risultati positivi alle mutazioni né per i campioni NTC, né per i campioni wild-type FFPE.

Impatto del DNA iniziale sui valori ΔC_T

Il livello di DNA iniziale è definito come la quantità totale di DNA EGFR amplificabile in un campione, calcolato sulla base dei valori C_T ricavati dalla reazione di controllo. Per dimostrare che le prestazioni del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono coerenti e uniformi lungo tutto l'intervallo C_T della reazione di controllo (23,70-31,10), tutti e sette i saggi di mutazione EGFR sono stati eseguiti su una serie di diluizioni 1:3 a 6 punti (DNA estratto da linee cellulari FFPE). Il valore C_T target per la diluizione 1 è stato di circa 24,70 per ogni mutazione. La diluizione finale, che ha generato un valore C_T di circa 32-33, non è rientrata nell'intervallo C_T della reazione di controllo. Nel complesso, i valori ΔC_T misurati a vari livelli di DNA totale iniziale sono risultati coerenti e uniformi lungo tutto l'intervallo valido del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Reattività crociata

Per valutare l'amplificazione non specifica, il DNA wild-type di EGFR è stato analizzato ad un livello elevato di DNA iniziale. I risultati dimostrano che i valori ΔC_T più bassi sono al di sopra dei limiti di cut-off impostati e ciò indica l'assenza di amplificazione non specifica.

Per valutare la possibile reattività crociata, le linee cellulari FFPE con un livello di DNA iniziale elevato sono state analizzate con tutte le miscele delle reazioni. I risultati dimostrano l'assenza di effetti dovuti alla reattività crociata tra le reazioni delle mutazioni. Tutti i valori ΔC_T minimi sono sempre stati al di sopra dei valori di cut-off del saggio per tutte le miscele delle reazioni e i campioni di DNA non corrispondenti.

Accuratezza: confronto con il metodo di riferimento analitico

Uno studio ha dimostrato la concordanza tra il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR e il sequenziamento bidirezionale di Sanger con riferimento allo stato mutazionale. Nello studio sono stati analizzati 360 campioni FFPE.

I campioni sono stati analizzati sia con il metodo Sanger, sia con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, per valutare la concordanza percentuale positiva (positive percent agreement, PPA), la concordanza percentuale negativa (negative percent agreement, NPA) e la concordanza percentuale complessiva (overall percent agreement, OPA). Questi valori percentuali sono riassunti nella Tabella 10, insieme ai corrispondenti intervalli di confidenza (IC) al 95% bilaterali.

Tabella 10. Analisi della concordanza

Misurazione	Concordanza percentuale (N)	IC 95%
Concordanza percentuale positiva	99,4% (157/158)	96,5-100,0%
Concordanza percentuale negativa	86,6% (175/202)	81,2-91,0%
Concordanza percentuale totale	92,2% (332/360)	89,0-94,8%

Dei 28 risultati discordanti rispetto alla concordanza percentuale totale:

- 1 campione (3,6%) è stato classificato come wild-type (ovvero, nessuna mutazione rilevata) dal kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, mentre il sequenziamento di Sanger ha rilevato una mutazione.
- In 27 campioni (96,4%) è stata rilevata una mutazione dal kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, mentre sono stati classificati come wild-type dal sequenziamento di Sanger.

Limite di sensibilità

È stato svolto uno studio per determinare il limite di sensibilità (limit of detection, LOD) di ognuna delle 29 mutazioni EGFR. È stato definito il valore LOD, che in un campione corrisponde al valore minimo di DNA mutante su un fondo di DNA wild-type a generare risultati positivi alla mutazione nel 95% dei risultati del test (C_{95}).

Per determinare il valore LOD per ogni mutazione, sono stati preparati campioni con percentuali di mutazione diverse a concentrazioni di DNA iniziale bassa e alta, che sono stati poi analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (Tabella 11). Il valore LOD per ogni saggio è stato calcolato tramite regressione logistica. Per verificare il limite di sensibilità sono stati analizzati campioni contenenti mutazioni corrispondenti al valore LOD definito, verificando la percentuale di risultati positivi al test.

Tabella 11. Limite di sensibilità determinato utilizzando campioni clinici FFPE, linee cellulari FFPE o plasmidi con livelli di DNA iniziale basso e alto

Esone	Mutazione	ID COSMIC*	Cambiamento delle basi	Valore LOD (% mutante)	
				Basso	Alto
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	— [¶]
19	Delezioni	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	— [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	— [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	— [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	— [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]
		12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Inserzioni	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	— [¶]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]

Esone	Mutazione	ID COSMIC*	Cambiamento delle basi	Valore LOD (% mutante)	
				Basso	Alto
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [‡]

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] Valori LOD determinati usando linee cellulari.

[‡] Valori LOD determinati usando plasmidi.

[§] Valori LOD determinati usando campioni clinici.

[¶] Non valutati

Interferenza

Effetti dei tessuti necrotici

I campioni clinici FFPE di NSCLC con un contenuto massimo di tessuto necrotico del 50%, sia per i campioni con mutazioni EGFR, sia per i campioni wild-type, non hanno prodotto interferenze con la classificazione dei risultati del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Sostanze esogene

Sono state analizzate alcune sostanze potenzialmente interferenti presenti nel processo di estrazione del DNA dai campioni mutanti e wild-type, a una concentrazione 10x: cera di paraffina, xilene, etanolo, proteinasi K. I risultati dimostrano che queste sostanze non interferiscono con la classificazione dei risultati del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Riproducibilità

Riproducibilità tra lotti

Il sistema per test del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR utilizza due kit distinti: il kit QIAamp DNA FFPE Tissue o il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue per l'isolamento del DNA, e il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per l'amplificazione del DNA e la rilevazione dello stato mutazionale EGFR. La riproducibilità e l'intercambiabilità tra i lotti sono state dimostrate utilizzando tre lotti del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue e tre lotti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. La percentuale

complessiva di classificazioni corrette tra lotti è stata del 97,8% (317 su 324) per il saggio di mutazione EGFR e del 100% (379 su 379) per i campioni wild-type.

Gestione dei campioni

La riproducibilità del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è stata valutata utilizzando sezioni estratte da tre blocchi di campioni FFPE, precisamente un campione con delezione nell'esone 19 (2235_2249del15), un campione con mutazione L858R nell'esone 21 e un campione wild-type. Per ogni campione, le estrazioni sono state effettuate in duplicato presso tre siti e le analisi sono state eseguite per tre giorni non consecutivi su un periodo di sei giorni, ottenendo in totale 18 punti dati per campione. In ogni sito due operatori hanno eseguito le analisi utilizzando un lotto del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (un lotto per laboratorio, tre lotti in totale) in associazione con lo stesso lotto di reagenti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR in tutti i siti. I test su tutti i campioni mutanti e wild-type hanno fornito risultati validi e hanno prodotto la classificazione attesa (classificazione corretta = 100%, 18 su 18 per ogni campione), indicando la riproducibilità e ripetibilità del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR nella fase pre-analitica di estrazione del DNA.

Precisione e riproducibilità

La precisione e la riproducibilità del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sono state valutate analizzando il DNA estratto da campioni clinici FFPE di NSCLC o da linee cellulari FFPE rappresentativi di tutti e sette i saggi di mutazione del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Nello studio sono stati inclusi anche campioni clinici FFPE wild-type di NSCLC (Tabella 12).

È stato applicato un modello di studio a matrice per valutare la riproducibilità dei saggi analizzando i campioni presso tre laboratori (siti), con tre lotti del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (tre lotti per tre siti), con due operatori per sito, con due strumenti per sito, con ogni campione (preparato a un livello prossimo al valore LOD) analizzato in duplicato su un periodo totale di 16 giorni. I test di riproducibilità di ogni singola mutazione sono stati condotti in giorni non consecutivi in ogni sito. La percentuale complessiva di classificazioni corrette è riportata in Tabella 12, alla pagina seguente.

Tabella 12. Riproducibilità del saggio - percentuale complessiva di classificazioni corrette per le mutazioni EGFR analizzate

Esone	Mutazione	ID COSMIC*	Classificazioni		% corrette IC 95% monolaterale inferiore
			Corrette/totali	% corrette	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Delezioni	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
	Inserzioni	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Wild-type	—	—	77/78	98,72	94,06

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

È stata utilizzata l'analisi delle componenti della varianza per stimare la deviazione standard e gli intervalli di confidenza al 95% per la variabilità nella stessa seduta, tra sedute diverse, tra giorni, tra lotti e tra siti. Tra tutte le componenti della varianza, il coefficiente di variazione (CV) totale è stato $\leq 14,11\%$ per tutte le mutazioni EGFR analizzate. Tra tutti i membri del pannello mutanti, il CV percentuale è $\leq 8,33\%$ tra lotti, tra giorni e tra sedute. Il CV percentuale per la variabilità in una stessa seduta (ripetibilità/precisione) è compreso nell'intervallo 5,99-13,49%.

Prestazioni cliniche

Risultati clinici GIOTRIF®

La sperimentazione clinica LUX-Lung 3 è stato uno studio internazionale, multicentrico, in aperto, randomizzato di fase 3, il cui obiettivo era valutare il farmaco afatinib rispetto alla chemioterapia come terapia di prima linea per pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare in stadio IIIB o IV che presentano una mutazione di attivazione dell'EGFR (ClinicalTrials.gov, numero NCT00949650). L'idoneità dei pazienti alla sperimentazione clinica è stata giudicata analizzando lo stato mutazionale dell'EGFR del paziente con il Clinical Trial Assay (CTA). Sono stati svolti test retrospettivi dei campioni di tessuto utilizzando il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. È stato svolto uno studio integrativo per valutare la concordanza tra il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR e il CTA.

Sulla base dei risultati del CTA, 345 pazienti sono stati ammessi nel set randomizzato (afatinib: 230 pazienti; chemioterapia: 115 pazienti). La principale dimostrazione dell'efficacia è la sopravvivenza senza progressione della malattia (Progression-Free Survival, PFS), secondo il giudizio di un comitato di revisione indipendente (independent review committee, IRC). Tra i 345 pazienti randomizzati, sono stati analizzati retrospettivamente i campioni tumorali di 264 pazienti (afatinib: 178 pazienti; chemioterapia: 86 pazienti) utilizzando il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. È stato dimostrato un miglioramento statisticamente significativo nella sopravvivenza senza progressione della

malattia, determinato dal comitato di revisione indipendente, nei pazienti randomizzati alla terapia con afatinib rispetto ai pazienti randomizzati a chemioterapia, nella popolazione CTA+ globale e nella popolazione del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA+. I risultati dell'efficacia complessiva sono illustrati nella Tabella 13 e nella Figura 19.

Tabella 13. Vantaggio clinico dei pazienti analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR nella popolazione della sperimentazione clinica LUX-Lung 3

Parametro	Popolazione del kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR+/CTA+ n = 264		Popolazione CTA+, n = 345	
	Chemioterapia n = 86	Afatinib n = 178	Chemioterapia n = 115	Afatinib n = 230
Sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS)				
Numero di decessi o progressioni della malattia, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
PFS mediana (mesi)	6,9	11,2	6,9	11,1
IC 95% PFS mediana	5,3, 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Rapporto di rischio	0,49		0,58	
IC 95% rapporto di rischio	0,35, 0,69		0,43, 0,78	
Valore P (test log-rank stratificato)*	< 0,0001		< 0,001	

* Stratificato per stato mutazionale dell'EGFR e razza.

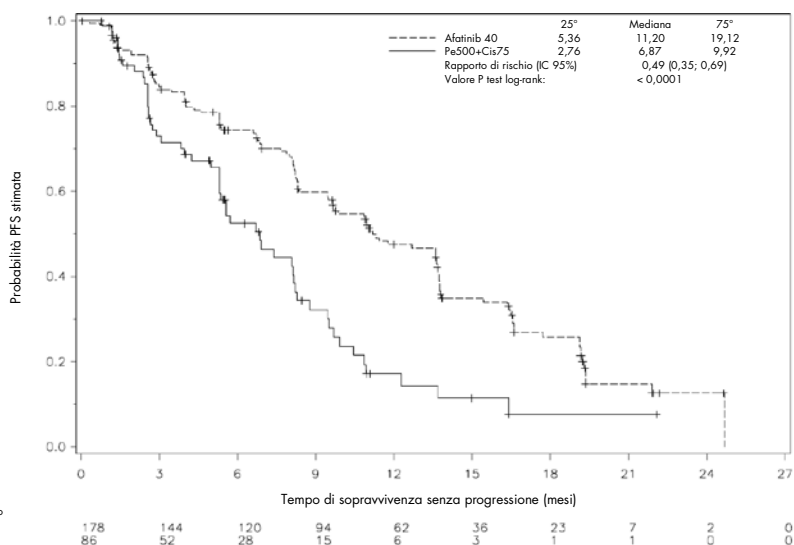


Figura 19. Curva Kaplan-Meier della sopravvivenza PFS secondo il comitato di revisione indipendente per gruppo di terapie (popolazione del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA+).

Dall'analisi del sottoinsieme del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA+ ($n = 264$) si evince un aumento significativo del tempo di sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS mediana 11,2 rispetto a 6,9 mesi) e minori probabilità che si verifichi un evento di malattia progressiva o decesso (rapporto di rischio = 0,49, IC 95% [0,35; 0,69], $p < 0,0001$) per i pazienti trattati con afatinib rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia. Il vantaggio clinico osservato nel sottoinsieme di pazienti analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è paragonabile a quello osservato nell'intera popolazione dello studio ($n = 345$).

Risultati clinici IRESSA®

La sperimentazione clinica IRESSA Follow-up Measure (abbreviata in IFUM, numero identificativo NCT01203917) è uno studio di fase 4, in aperto, a braccio singolo, il cui obiettivo era caratterizzare l'efficacia e la sicurezza/tollerabilità del gefitinib come farmaco di prima linea per i pazienti caucasici affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio IIIA/B/IV, localmente avanzato o metastatico, con mutazioni del gene

EGFR. Lo studio IFUM era stato concepito per la valutazione del tasso di risposta obiettiva secondo i criteri RECIST, relativamente a un gruppo di pazienti caucasici affetti da NSCLC con mutazioni del gene EGFR selezionati in modo prospettico.

Ai fini dell'idoneità, i campioni tumorali dei pazienti con mutazioni EGFR dovevano presentare una delezione nell'esone 19, le sostituzioni L858R, L861Q o G719X e nessuna mutazione T790M o S768I oppure inserzioni nell'esone 20, come stabilito in modo prospettico dal CTA (Clinical Trial Assay). I test retrospettivi sui campioni appartenenti ai pazienti selezionati per la sperimentazione clinica IFUM sono stati eseguiti con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR della linea Companion Diagnostic. È stato condotto uno studio integrativo per valutare la concordanza tra i risultati del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR e il test utilizzato dal CTA per selezionare i pazienti idonei alla sperimentazione clinica IFUM. Per quanto riguarda la rilevazione delle delezioni nell'esone 19 e della mutazione L858R del gene EGFR, la concordanza complessiva tra i due saggi è stata del 98,2% ($n = 700/713$; IC 95%: 96,9%, 99,0%), la concordanza percentuale positiva (PPA) è stata dell'88,2% ($n = 90/102$; IC 95%: 80,4%, 93,8%) e la concordanza percentuale negativa (NPA) è stata del 99,8% ($n = 610/611$; IC 95%: 99,1%, 100,0%).

Il test CTA aveva prodotto risultati per 859 pazienti sottoposti a screening, dei quali 106 idonei alla terapia con gefitinib. Tra gli 859 campioni che avevano generato un risultato con il test CTA, 765 erano disponibili per eseguire i test retrospettivi con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, inclusi 87 campioni con un risultato positivo per le mutazioni EGFR sia con il test CTA che con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Il principale indicatore di efficacia è stato il tasso di risposta obiettiva (Objective Response Rate, ORR), così come valutato da una revisione centrale in cieco indipendente (Blinded Independent Central Review, BICR) e dai ricercatori. Il beneficio clinico osservato nel sottoinsieme di pazienti analizzati con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è paragonabile a quello osservato nell'intera popolazione dello studio.

I risultati dell'efficacia complessiva sono illustrati nella Tabella 14.

Tabella 14. Beneficio clinico per i pazienti sottoposti al test *therascreen* EGFR RGQ PCR nella popolazione della sperimentazione clinica IFUM

Parametro	Popolazione del kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR+, n = 87	Popolazione CTA+, n = 106
Tasso di risposta obiettiva (ORR) secondo il BICR		
Numero di risposte (N)	42	53
ORR, % (IC 95%)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Durata media della risposta (mesi)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Tasso di risposta obiettiva (ORR) secondo i ricercatori		
Numero di risposte (N)	62	74
ORR, % (IC 95%)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Durata media della risposta (mesi)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded Independent Central Review; **IC:** Intervallo di confidenza; **CTA:** Clinical Trial Assay.

Nota: la popolazione Kit+ rappresenta i risultati positivi per le delezioni dell'esone 19/le mutazioni L8585R/L861Q/G719X.

Dal momento che il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR non è stato coinvolto nello screening dei pazienti idonei alla sperimentazione clinica IFUM, sono state condotte ulteriori analisi di efficacia per tenere conto anche dei pazienti esclusi dalla sperimentazione perché negativi al test CTA, ma che avrebbero potuto generare risultati positivi con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (indicati come kit *therascreen* EGFR RGQ PCR+/CTA-), oltre che dei pazienti ammessi alla sperimentazione clinica che non hanno però prodotto risultati validi ripetendo il test con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (indicati come kit *therascreen* EGFR RGQ PCR sconosciuti/CTA+). In linea generale, i risultati ottenuti con tutte queste analisi ipotetiche hanno confermato i risultati ottenuti con l'analisi di efficacia primaria.














Riferimenti

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* **26** (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
 11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
 <N>	Contenuto sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Tenere al riparo dalla luce
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
	Rappresentante autorizzato
Rn	“R” indica la revisione delle Istruzioni per l’uso (manuale) e “n” indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione

Appendice A: protocollo del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR per la procedura manuale

Questa sezione contiene le istruzioni per l'uso del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR con il software Rotor-Gene Q versione 2.3 in modalità aperta (ovvero senza utilizzare il Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Informazioni generali

- Per un elenco dei materiali necessari, vedere "Materiale necessario ma non fornito" a pagina 15.
- Per istruzioni complete sulla preparazione e sull'allestimento dei campioni, vedere "Protocollo: Valutazione del campione" a pagina 22 e "Protocollo: rilevazione delle mutazioni EGFR" a pagina 36.
- Prima di iniziare una seduta, accertarsi che i parametri di ciclaggio siano corretti.

Protocollo: creazione di un profilo di temperature

Prima di iniziare, creare un profilo di temperature per l'analisi con il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. I parametri di ciclaggio sono gli stessi descritti per le procedure di valutazione del campione di DNA e per la rilevazione delle mutazioni EGFR.

Procedura

Nella Tabella 15 sono riassunti i parametri di ciclaggio.

Tabella 15. Profilo di temperature

Cicli	Temperatura	Ora	Acquisizione di dati
1	95°C	15 minuti	No
40	95°C	30 secondi	No
	60°C	60 secondi	Verde e giallo

1. Fare doppio clic sull'icona del software Rotor-Gene Q serie 2.3, sul desktop del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx.
2. 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).
3. Come tipo di rotore selezionare "72-Well Rotor" (Rotore a 72 pozzetti). Confermare che l'anello bloccante è montato selezionando la casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato). Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 20).

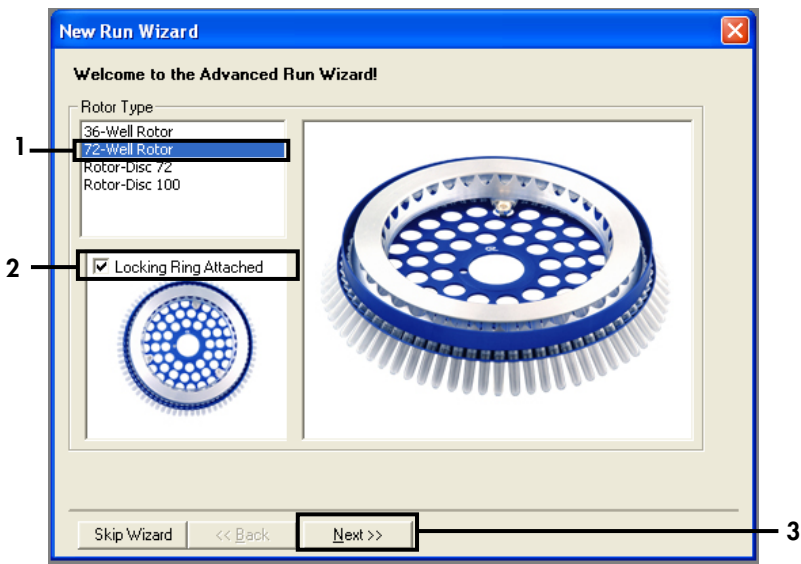


Figura 20. Finestra di dialogo "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta). 1 = "Rotor Type" (Tipo rotore); 2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato); 3 = "Next" (Avanti).

4. 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 21).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Figura 21. Immissione del nome dell'operatore e dei volumi delle reazioni. 1 = campo "Operator" (Operatore) e campo "Notes" (Annotazioni); 2 = campo "Reaction Volume" (Volume reazione) e "Sample Layout" (Configurazione campioni); 3 = "Next" (Avanti).

5. Fare clic su "Edit Profile" (Modifica profilo) nella finestra di dialogo "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta) (Figura 22), quindi controllare i parametri della seduta sulla base delle informazioni fornite nei seguenti passaggi.

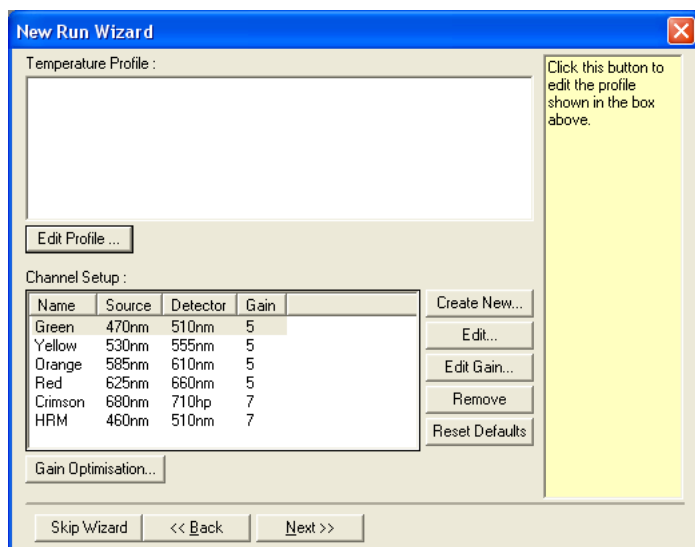


Figura 22. "Edit Profile" (Modifica profilo) nella finestra di dialogo "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta).

6. Fare clic su "Insert after" (Inserisci dopo), quindi selezionare "New Hold at Temperature" (Nuova sospensione alla temperatura) (Figura 23).

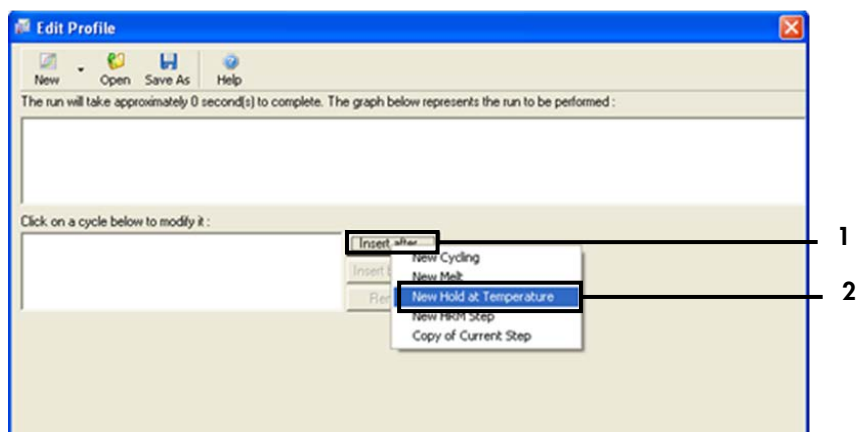


Figura 23. Aggiunta di una fase di incubazione iniziale. 1 = "Insert after" (Inserisci dopo); 2 = "New Hold at Temperature" (Nuova sospensione alla temperatura).

7. Cambiare “Hold Temperature” (Temperatura di sospensione) in “95°C” e “Hold Time” (Durata sospensione) in “15 mins 0 secs” (15 minuti 0 secondi). Fare clic su “Insert after” (Inserisci dopo), quindi selezionare “New Cycling” (Nuovo ciclaggio) (Figura 24).

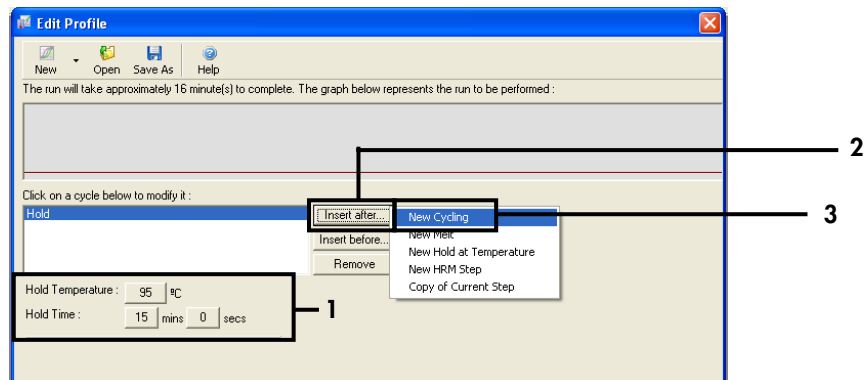


Figura 24. Passaggio di incubazione iniziale a 95°C. 1 = “Hold Temperature” (Temperatura di sospensione) e “Hold Time” (Durata sospensione); 2 = “Insert after” (Inserisci dopo); 3 = “New Cycling” (Nuovo ciclaggio).

8. Impostare 40 come numero di ripetizioni del ciclo. Selezionare il primo passaggio e impostare su “95°C for 30 secs” (95°C per 30 secondi) (Figura 25).

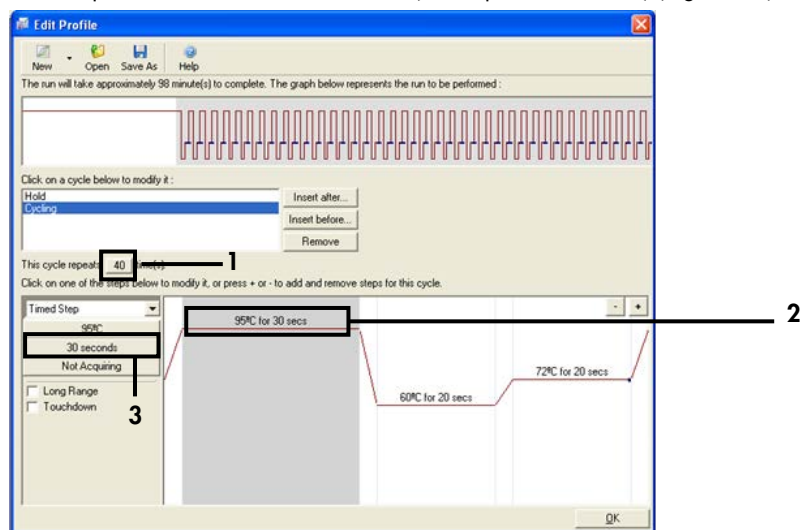


Figura 25. Passaggio di ciclaggio a 95°C. 1 = casella relativa al numero di ripetizioni dei cicli; 2 = Primo passaggio: impostazione temperatura; 3 = Secondo passaggio: impostazione durata.

9. Evidenziare il secondo passaggio e impostare su "60°C for 60 secs" (60°C per 60 secondi). Abilitare l'acquisizione di dati in questo passaggio selezionando "Not Acquiring" (No acquisizione) (Figura 26).

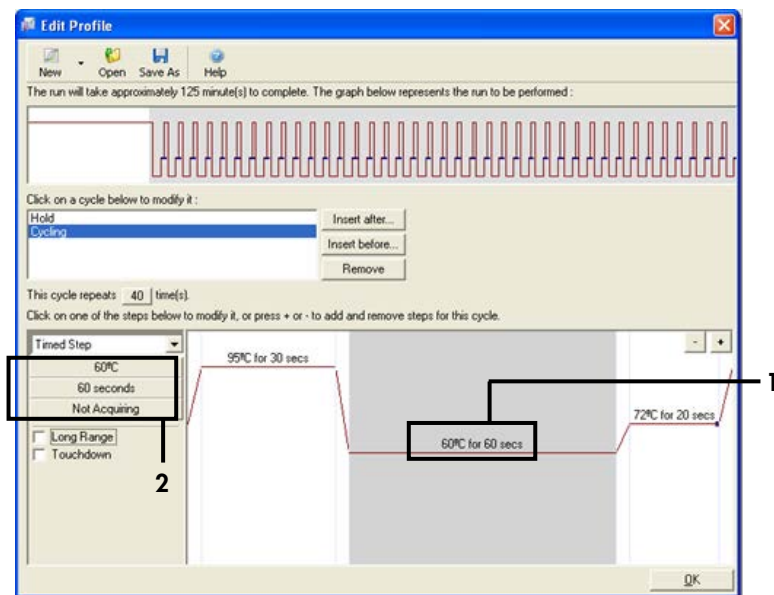


Figura 26. Passaggio di ciclaggio a 60°C. 1 = Secondo passaggio: impostazione temperatura e durata; 2 = pulsante "Not Acquiring" (No acquisizione).

10. Impostare i canali di acquisizione "Green" (Verde) e "Yellow" (Giallo) selezionando ">" per spostare questi canali dall'elenco "Available Channels" (Canali disponibili). Fare clic su "OK" (Figura 27).

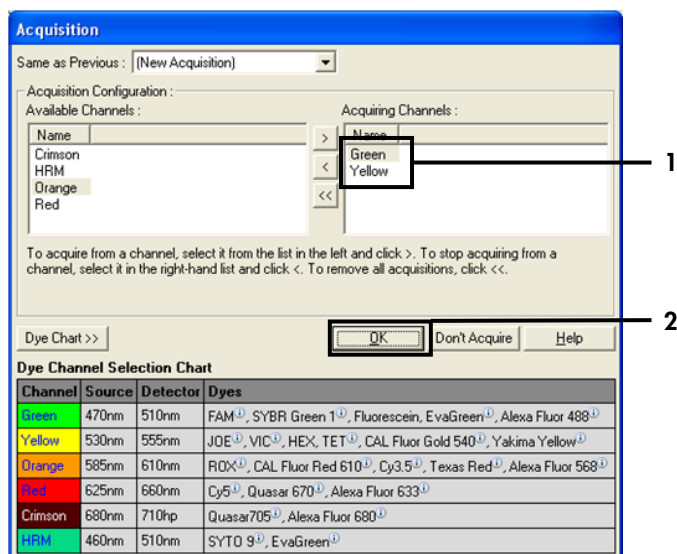


Figura 27. Acquisizione nel passaggio di ciclaggio a 60°C. 1 = canali selezionati; 2 = "OK".

11. Evidenziare il terzo passaggio e cancellare facendo clic su "-". Fare clic su "OK" (Figura 28).

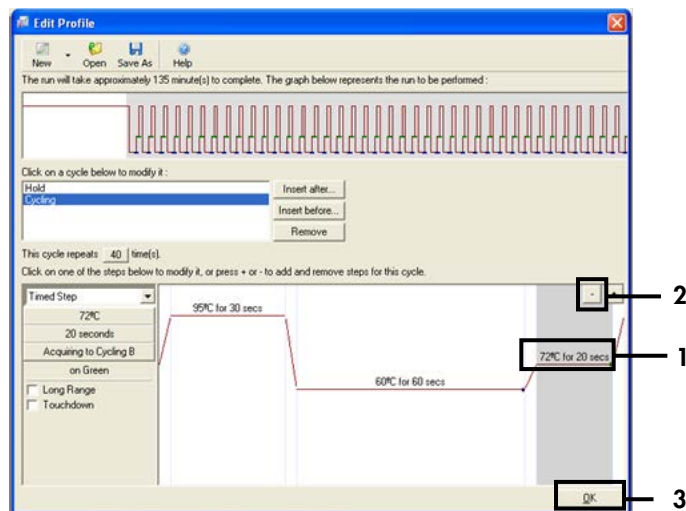


Figura 28. Rimozione del passaggio di estensione. 1 = Terzo passaggio; 2 = Delete (Elimina); 3 = "OK".

12. Nella finestra di dialogo successiva fare clic su “Gain Optimisation” (Ottimizzazione del guadagno) (Figura 29).

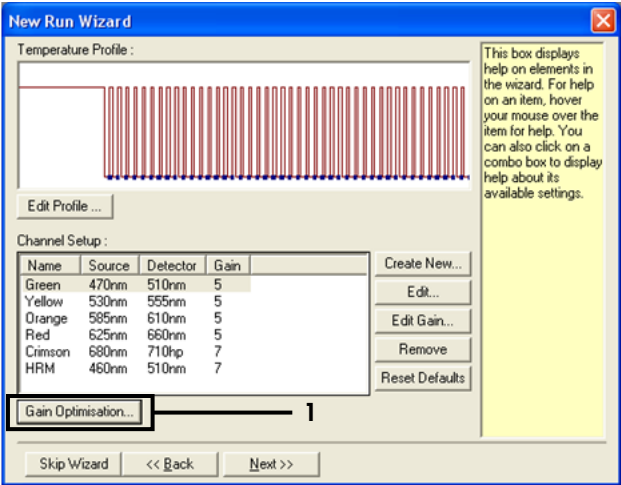


Figura 29. Ottimizzazione del guadagno (1).

13. Fare clic su “Optimise Acquiring” (Ottimizza acquisizione). Per ogni canale vengono visualizzate le impostazioni corrispondenti. Accettare i valori predefiniti facendo clic su “OK” per entrambi i canali (Figura 30).

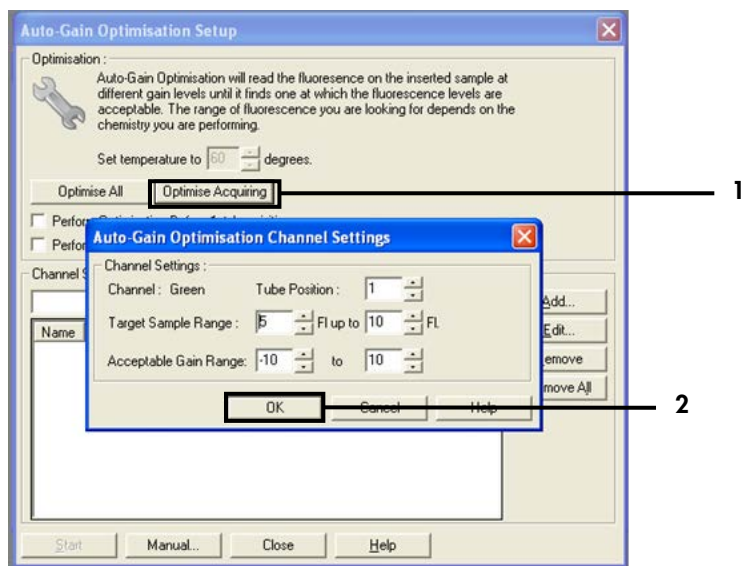


Figura 30. Ottimizzazione automatica del guadagno per il canale verde. 1 = "Optimise Acquiring" (Ottimizza acquisizione); 2 = "OK".

14. Selezionare la casella "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Esegui ottimizzazione prima della 1a acquisizione), quindi fare clic su "Close" (Chiudi) per tornare alla procedura guidata (Figura 31).

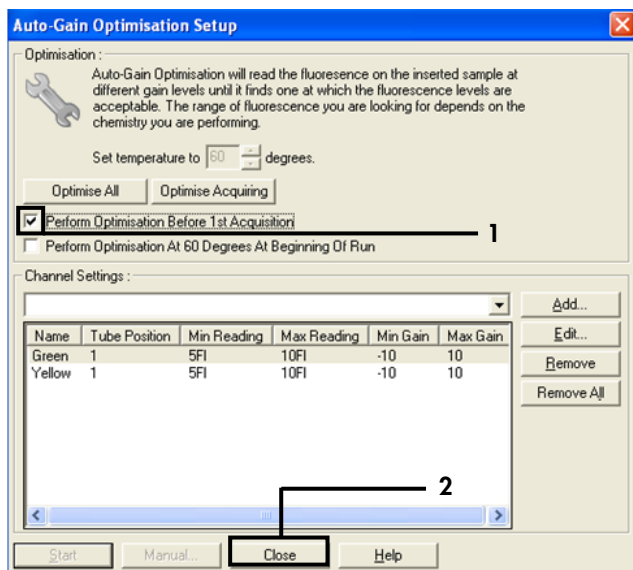


Figura 31. Selezione dei canali verde e giallo. 1 = casella di spunta "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Esegui ottimizzazione prima della 1a acquisizione); 2 = "Close" (Chiudi).

15. Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 32) e salvare il modello del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (file *.ret) nella cartella desiderata selezionando "Save Template" (Salva modello).

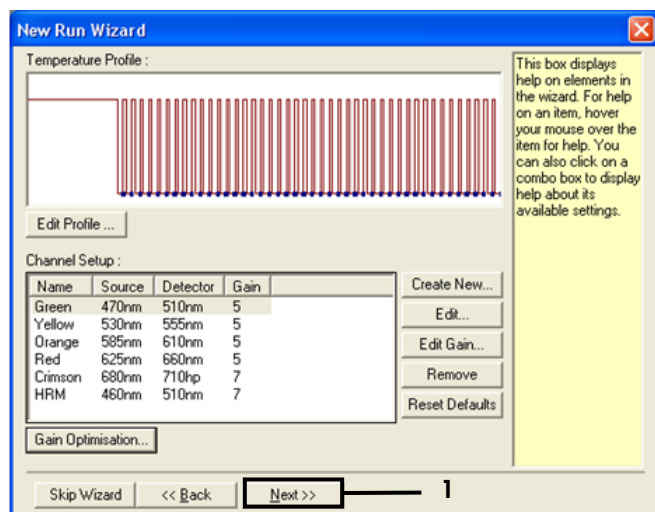


Figura 32. "Next" (Avanti) (1).

Procedura (manuale)

Protocollo: valutazione dei campioni (manuale)

Questo protocollo consente di valutare il DNA totale amplificabile presente nei campioni e deve essere eseguito prima dell'analisi delle mutazioni EGFR.

- Preparare i campioni secondo le modalità descritte nel paragrafo "Protocollo: Valutazione del campione" a pagina 22, fino al passaggio 11.
- Configurare la seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx con le impostazioni descritte nel paragrafo "Protocollo: *configurazione* del Rotor-Gene Q per il kit theascreen EGFR RGQ PCR" a pagina 87.
- Al termine della seduta, analizzare i dati seguendo le istruzioni contenute nel paragrafo "Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni" a pagina 93.

Protocollo: rilevazione delle mutazioni EGFR (manuale)

- Se supera la valutazione, il campione può essere analizzato al fine di rilevare eventuali mutazioni EGFR.
- Preparare i campioni secondo le modalità descritte nel paragrafo "Protocollo per la determinazione delle mutazioni EGFR" a pagina 36, fino al passaggio 11.
- Configurare la seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx con le impostazioni descritte nel paragrafo "Protocollo: *configurazione* del Rotor-Gene Q per il kit theascreen EGFR RGQ PCR" a pagina 87.
- Al termine della seduta, analizzare i dati seguendo le istruzioni contenute nel paragrafo "Analisi dei dati per la rilevazione della mutazione EGFR" a pagina 95.

Protocollo: configurazione del Rotor-Gene Q per il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Procedura

1. Aprire il software Rotor-Gene Q versione 2.3 e selezionare il profilo di temperature appropriato (file *.ret) per il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Per istruzioni sulla creazione del profilo di temperature e la verifica dei parametri della seduta, vedere "Protocollo: creazione di un profilo di temperature" a pagina 75.

2. Assicurarsi che sia selezionato il rotore corretto e spuntare la casella per confermare che l'anello bloccante è montato. Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 33).

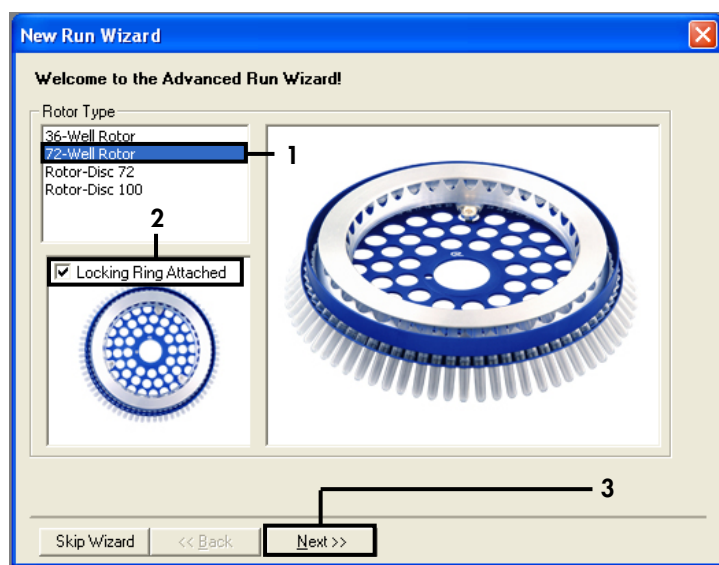


Figura 33. Finestra di dialogo "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta) e schermata di benvenuto.

1 = "Rotor Type" (Tipo rotore);

2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello bloccante collegato); 3 = "Next" (Avanti).

3. Immettere il nome dell'operatore. Aggiungere eventuali note, controllare che il volume della reazione sia impostato su 25 e che nella casella "Sample Layout" (Configurazione campioni) sia indicato "1, 2, 3...". Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 34).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : — 1

Notes : — 2

Reaction Volume (µL): — 3

Sample Layout : — 4

— 5

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Figura 34. Schermata "New Run Wizard" (Creazione guidata nuova seduta). 1 = "Operator" (Operatore); 2 = "Notes" (Annotazioni); 3 = "Reaction Volume" (Volume reazione) 4 = campo "Sample Layout" (Configurazione campioni); 5 = "Next" (Avanti).

4. Nella finestra successiva è possibile modificare il profilo di temperature. Non sono necessarie modifiche se il profilo di temperature è stato creato in base alle istruzioni fornite nel paragrafo "Protocollo: creazione di un profilo di temperature" a pagina 75. Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 35).

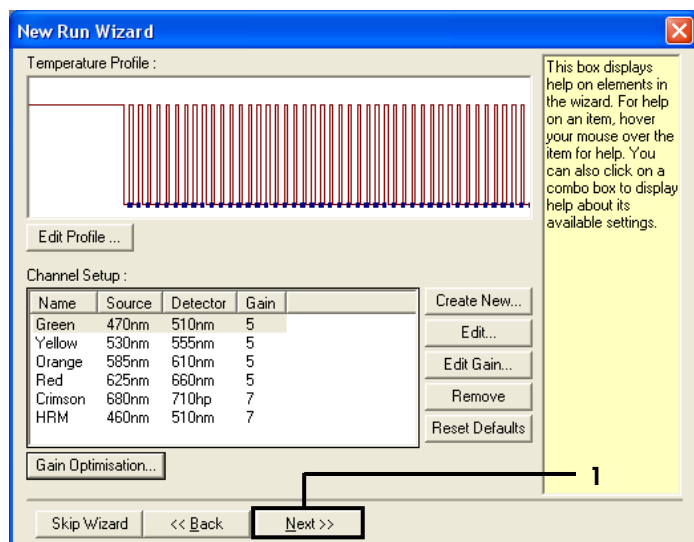


Figura 35. Finestra di dialogo “New Run Wizard” (Creazione guidata nuova seduta) e schermata di modifica delle temperature. 1 = “Next” (Avanti).

5. Controllare il riepilogo e fare clic su “Start Run” (Avvia seduta) per salvare il file della seduta e avviare la seduta (Figura 36).

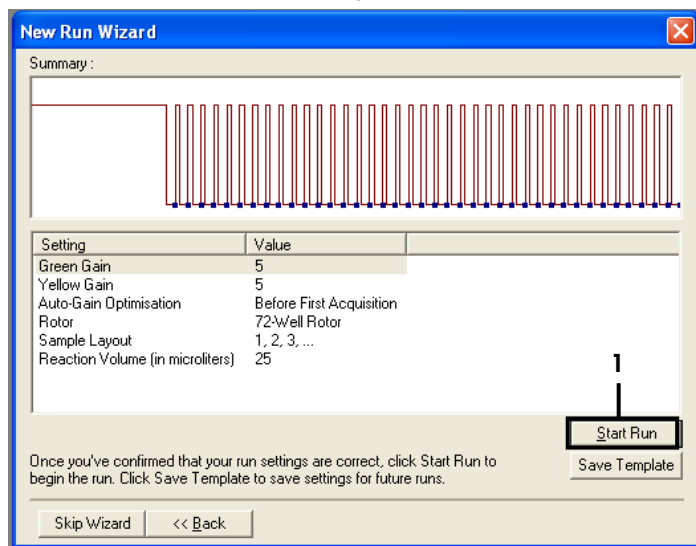


Figura 36. Finestra di dialogo “New Run Wizard” (Creazione guidata nuova seduta) e schermata di riepilogo [1 = “Start Run” (Avvia seduta)].

6. Dopo l’avvio della seduta viene visualizzata una nuova finestra. È possibile inserire subito i nomi dei campioni oppure, facendo clic su “Finish” (Fine), immettere i nomi in seguito, selezionando “Sample” (Campione) durante o al termine della seduta.
7. Facendo clic su “Finish and Lock Samples” (Fine e blocca campioni) verrà impedita la modifica dei nomi dei campioni. L’utente deve prestare particolare attenzione durante l’inserimento dei nomi dei campioni per assicurare una corretta esecuzione dei test e delle analisi sui campioni.

Nota: durante l’inserimento dei nomi dei campioni, è opportuno lasciare vuoti i campi delle provette vuote nella colonna “Name” (Nome).

8. Al termine della seduta, analizzare i dati in base alle istruzioni fornite nei paragrafi “Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni” a pagina 93 o “Analisi dei dati per la rilevazione della mutazione EGFR” a pagina 95, a seconda dei casi.

9. Se è necessario creare i report di quantificazione, fare clic sull'icona "Reports" nella barra degli strumenti del file della seduta Rotor-Gene Q.
10. Nel browser dei report, sotto a "Report Categories" (Categorie di report), fare clic su "Cycling A Green (page 1)" [Ciclaggio A Verde (pagina 1)] (Figura 37).

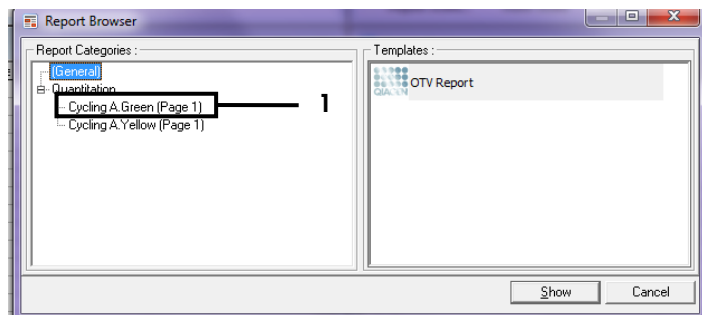


Figura 37. Browser dei report (1 = "Cycling A. Green (Page 1)" [Ciclaggio A. Verde (pagina 1)]).

11. Selezionare "Quantitation (Full Report)" [Quantificazione (Report completo)] sotto a "Templates" (Modelli) (Figura 38).

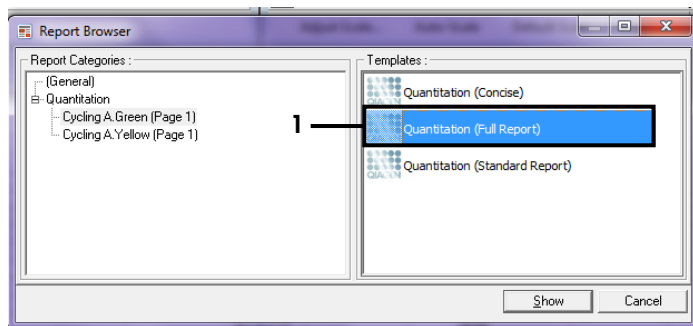


Figura 38. Report di quantificazione completo (1).

12. Fare clic su "Show" (Visualizza) per generare il report.
13. Fare clic su "Save As" (Salva con nome) per salvare una versione elettronica del report.
14. Ripetere per "Cycling A Yellow (Page 1)" [Ciclaggio A Giallo (Pagina 1)].

Interpretazione dei risultati (manuale)

Al termine della seduta del kit *therascreen* EGFR RGQ PCR (per la valutazione del campione di DNA o l'analisi della mutazione EGFR), è possibile analizzare i dati in base alle procedure descritte di seguito:

- Impostazioni del software per l'analisi
- Analisi di valutazione del campione di DNA (manuale)
Nota: per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 4 a pagina 26
- Analisi per la rilevazione della mutazione EGFR (manuale)
Nota: per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 7 a pagina 39

Impostazioni del software relative all'analisi

1. Aprire il file della seduta desiderato (*.rex) utilizzando il software Rotor-Gene Q versione 2.3.
2. Se non è stato assegnato un nome ai campioni prima di eseguire la seduta, fare clic su "Edit Samples" (Modifica campioni).
3. Assegnare i nomi ai campioni nella colonna "Name" (Nome).
Nota: lasciare vuoti i nomi delle provette vuote.
4. Fare clic su "Analysis" (Analisi). Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A. Yellow" (Ciclaggio A. Giallo) per controllare il canale giallo (HEX).
5. Fare clic su "Named On" (Nominati).
Nota: in questo modo le provette vuote non rientrano nell'analisi.
6. Selezionare "Dynamic tube" (Provetta dinamica).
7. Selezionare "Slope Correct" (Correzione slope).

8. Selezionare "Linear scale" (Scala lineare).
9. Selezionare "Take off Adj." (Correzione take-off) e inserire i valori 15,01 nella casella in alto "If take off point was calculated before cycle" (Se il punto di take-off è stato calcolato prima del ciclo) e 20,01 nella casella in basso "then use the following cycle and take off point" (usa ciclo e punto di take-off seguente).
10. Impostare una soglia fino a 0,02 e controllare i valori C_T del canale giallo (HEX).
11. Nella pagina dell'analisi fare clic su "Cycling A Green" (Ciclaggio A Verde) per visualizzare il canale verde (FAM).
12. Selezionare "Named On" (Nominati).
13. Selezionare "Dynamic tube" (Provetta dinamica).
14. Selezionare "Slope Correct" (Correzione slope).
15. Selezionare "Linear scale" (Scala lineare).
16. Selezionare "Take off Adj." (Correzione take-off) e inserire i valori 15,01 nella casella in alto "If take off point was calculated before cycle" (Se il punto di take-off è stato calcolato prima del ciclo) e 20,01 nella casella in basso "then use the following cycle and take off point" (usa ciclo e punto di take-off seguente).
17. Impostare una soglia fino a 0,075 e controllare i valori C_T del canale verde (FAM).

Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni

Al termine della seduta di valutazione del campione di DNA, vedere "Impostazioni del software relative all'analisi" a pagina 92, quindi analizzare i dati nel modo seguente. (Per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 4 a pagina 26.)

Analisi dei controlli della seduta

Controllo negativo

Per confermare la totale assenza di contaminazione da template, il controllo NTC non deve generare un valore C_T inferiore a 40 nel canale verde (FAM).

Per essere certi che la seduta sia stata impostata correttamente, il controllo NTC deve presentare un'amplificazione compresa tra 29,85 e 35,84 nel canale giallo (HEX). I valori specificati sono compresi in questi intervalli.

Controllo positivo

Il controllo positivo (PC) EGFR deve produrre un valore C_T nel canale verde (FAM) compreso tra 28,13 e 34,59. Un valore che non rientra in questo intervallo può indicare un problema relativo alla configurazione del saggio. La seduta ha avuto esito negativo.

Nota: i dati del campione non devono essere utilizzati se entrambi i controlli, positivo e negativo, sono falliti.

Analisi del campione

Se i controlli della seduta di valutazione del campione di DNA sono validi, l'analisi può proseguire. Il valore C_T di controllo per un campione deve essere compreso tra 23,70 e 31,10 nel canale verde (FAM). Se il valore C_T del campione non rientra in questo intervallo di valori, attenersi alle indicazioni seguenti.

- Valore C_T del saggio di controllo del campione $< 23,70$

I campioni con un valore C_T di controllo $< 23,70$ (alta concentrazione di DNA) determineranno un sovraccarico per i saggi di mutazione, pertanto devono essere diluiti. Per rilevare ogni mutazione ad un livello basso, i campioni molto concentrati vengono diluiti in modo da rientrare nell'intervallo C_T compreso tra 23,70 e 31,10. La diluizione del DNA del campione aumenta il valore C_T (una diluizione 1:1 aumenta di 1,0 circa il valore C_T). Diluire i campioni con l'acqua fornita nel kit (acqua per diluizione [Dil.]).

- Valore C_T del saggio di controllo del campione $> 31,10$

È consigliabile ripetere l'estrazione dei campioni con un valore C_T di controllo $> 31,10$ nel canale verde (FAM). Il DNA template iniziale non è sufficiente per rilevare tutte le mutazioni EGFR con i valori di cut-off indicati per il saggio.

Analisi dei dati per la rilevazione della mutazione EGFR

Ogni campione di DNA deve superare la valutazione prima di poter essere sottoposto ai test per le mutazioni EGFR (vedere "Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni" a pagina 93).

Al termine della seduta di rilevazione della mutazione EGFR, vedere "Impostazioni del software relative all'analisi" a pagina 92, quindi analizzare i dati nel modo seguente. (Per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 7 a pagina 39.)

Analisi dei controlli della seduta

Fare riferimento al diagramma di flusso per l'analisi dei controlli nella seduta (Figura 39).

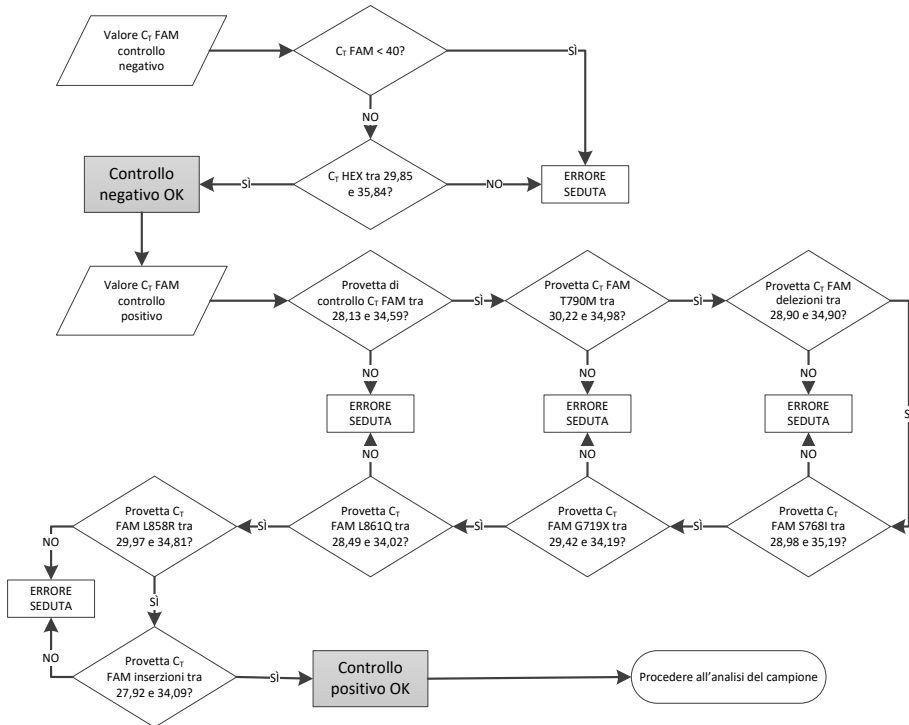


Figura 39. Diagramma di flusso dell'analisi dei controlli della seduta per la rilevazione delle mutazioni EGFR.

Controllo negativo

Per confermare la totale assenza di contaminazione da template, il controllo NTC di ogni saggio di mutazione EGFR non deve generare un valore C_T inferiore a 40 nel canale verde (FAM).

Per essere certi che la seduta sia stata impostata correttamente, il controllo NTC deve presentare un'amplificazione compresa tra 29,85 e 35,84 nel canale giallo (HEX). I valori specificati sono compresi in questi intervalli.

Controllo positivo

Per ogni saggio di mutazione EGFR, il controllo positivo (PC) EGFR deve produrre un valore C_T nel canale verde (FAM) compreso nell'intervallo indicato nella Tabella 16. Un valore che non rientra in questo intervallo può indicare un problema relativo alla configurazione del saggio. La seduta ha avuto esito negativo.

Nota: i dati del campione non devono essere utilizzati se entrambi i controlli della seduta, positivo e negativo, sono falliti.

Tabella 16. Intervalli C_T accettabili per i controlli positivi della reazione (saggio di rilevazione delle mutazioni EGFR)

Miscela di reazione	Campione	Canale	Intervallo C_T
Controllo	PC	Verde	tra 28,13 e 34,59
T790M	PC	Verde	tra 30,22 e 34,98
Delezioni	PC	Verde	tra 28,90 e 34,90
L858R	PC	Verde	tra 29,97 e 34,81
L861Q	PC	Verde	tra 28,49 e 34,02
G719X	PC	Verde	tra 29,42 e 34,19
S768I	PC	Verde	tra 28,98 e 35,19
Inserzioni	PC	Verde	tra 27,92 e 34,09

Analisi dei campioni: valore C_T nel canale verde (FAM) di controllo dei campioni

Se i controlli positivo e negativo per la seduta di rilevazione delle mutazioni EGFR sono validi, la rilevazione delle mutazioni EGFR nei campioni può proseguire.

Il valore C_T di controllo per un campione nel canale verde (FAM) deve essere compreso tra 23,70 e 31,10. Per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 7 a pagina 40.

Se il valore C_T di controllo del campione non rientra in questo intervallo, attenersi alle indicazioni seguenti.

- Valore C_T del saggio di controllo del campione $< 23,70$

I campioni con un valore C_T di controllo $< 23,70$ (alta concentrazione di DNA) determineranno un sovraccarico per i saggi di mutazione, pertanto devono essere diluiti. Per rilevare ogni mutazione ad un livello basso, i campioni molto concentrati vengono diluiti in modo da rientrare nell'intervallo C_T compreso tra 23,70 e 31,10. La diluizione del DNA del campione aumenta il valore C_T (una diluizione 1:1 aumenta di 1,0 circa il valore C_T). Diluire i campioni con l'acqua fornita nel kit (acqua per diluizione [Dil.]).

- Valore C_T del saggio di controllo del campione $> 31,10$

È consigliabile ripetere l'estrazione dei campioni con un valore C_T di controllo $> 31,10$ nel canale verde (FAM). Il DNA template iniziale non è sufficiente per rilevare tutte le mutazioni EGFR con i valori di cut-off indicati per il saggio.

Fare riferimento al diagramma di flusso per l'analisi dei campioni per la rilevazione delle mutazioni EGFR (Figura 40).

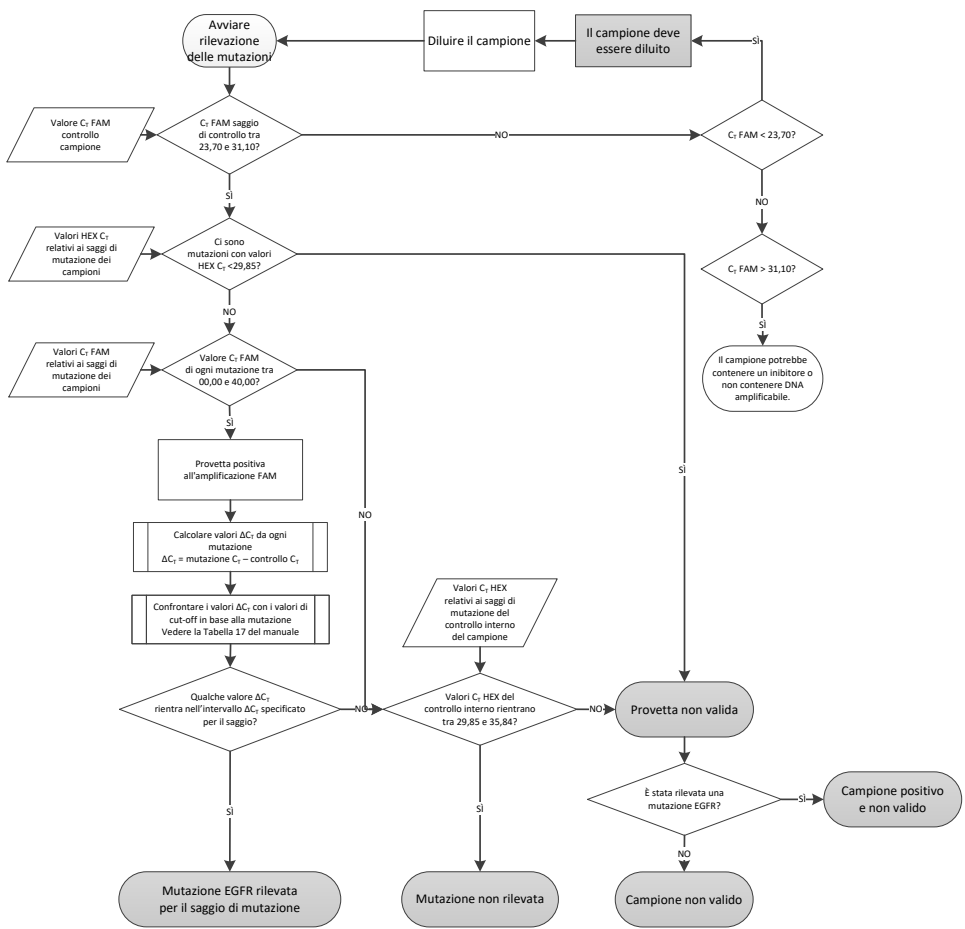


Figura 40. Diagramma di flusso dell'analisi dei campioni per la rilevazione delle mutazioni EGFR.

Analisi dei campioni: valore C_T nel canale giallo (HEX) del controllo interno dei campioni

Fare riferimento al diagramma di flusso per l'analisi dei campioni per la rilevazione delle mutazioni EGFR (Figura 40).

È necessario analizzare tutte le provette di ogni campione. Verificare che ogni provetta generi un segnale HEX compreso tra 29,85 e 35,84 dal controllo interno nel canale giallo (HEX). I possibili scenari sono tre:

- Se il valore C_T del controllo interno è inferiore all'intervallo specificato ($< 29,85$) per tutti i saggi di mutazione, il risultato non è valido per l'amplificazione nel canale giallo (HEX). L'amplificazione nel canale giallo (HEX) per la provetta in questione non è valida.
- Se il valore C_T del controllo interno è compreso nell'intervallo specificato (tra 29,85 e 35,84), il risultato è positivo per l'amplificazione nel canale giallo (HEX). L'amplificazione nel canale giallo (HEX) per la provetta in questione è valida.
- Se il valore C_T del controllo interno è superiore all'intervallo specificato ($> 35,84$), il risultato è negativo per l'amplificazione del canale giallo (HEX).

Se c'è amplificazione nel canale verde (FAM), ma il valore ΔC_T di tale reazione è inferiore o uguale al valore cut-off del saggio per la provetta interessata, l'amplificazione nel canale giallo (HEX) è valida. Se non c'è amplificazione nel canale verde (FAM) per la provetta o il valore ΔC_T è superiore al valore cut-off del saggio, l'amplificazione nel canale giallo (HEX) non è valida.

L'amplificazione del controllo interno nel canale giallo (HEX) può fallire a causa dell'inibizione della PCR. Diluendo il campione si potrebbe ridurre l'effetto degli inibitori. Tuttavia tenere presente che in questo modo viene diluito anche il DNA target nel campione. Diluire i campioni con l'acqua fornita nel kit (acqua per diluizione [Dil.]).

Analisi dei campioni: valore C_T nel canale verde (FAM) dei saggi di mutazione dei campioni

È necessario confrontare i valori del canale verde (FAM) delle sette miscele delle reazioni delle mutazioni EGFR con i valori riportati nella Tabella 17. I valori specificati sono compresi nell'intervallo di valori illustrato. (Per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 7 a pagina 39.)

Tabella 17. Valori accettabili per le reazioni delle mutazioni EGFR dei campioni nel canale verde (FAM) (saggio di rilevazione delle mutazioni EGFR)

Saggio	Intervallo C_T	Cut-off (ΔC_T)
T790M	tra 0,00 e 40,00	$\leq 7,40$
Delezioni	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,00$
L858R	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,90$
L861Q	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,90$
G719X	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,90$
S768I	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,90$
Inserzioni	tra 0,00 e 40,00	$\leq 8,00$

- Se il valore C_T nel canale verde (FAM) per il campione rientra nell'intervallo specificato, il risultato è positivo per l'amplificazione FAM.
- Se il valore C_T nel canale verde (FAM) è al di sopra dell'intervallo specificato o non c'è amplificazione, il risultato è negativo per l'amplificazione FAM.

Calcolare nel modo seguente il valore ΔC_T per ogni provetta di rilevazione della mutazione EGFR positiva per l'amplificazione FAM, verificando che i valori C_T relativi alla mutazione e al controllo provengano dallo stesso campione. (Per conoscere la disposizione delle provette, fare riferimento alla Tabella 7 a pagina 39.)

$$\Delta C_T = [\text{valore } C_T \text{ del saggio di mutazione}] - [\text{valore } C_T \text{ del saggio di controllo}]$$

Confrontare il valore ΔC_T per il campione con il punto di cut-off per il saggio in questione (Tabella 17). Accertarsi di utilizzare il punto di cut-off corretto.

Il punto di cut-off è il punto al di sopra del quale potrebbe essere generato un segnale positivo per un saggio a causa del 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 di un saggio, il campione viene classificato come negativo, o al di sopra dei limiti di sensibilità del kit per il saggio.

Ogni reazione di mutazione per ogni campione può avere uno dei seguenti stati:

- Mutazione rilevata
- Mutazione non rilevata
- Non valido

Mutazione rilevata

L'amplificazione nel canale verde (FAM) è positiva e il valore ΔC_T è minore o uguale al valore di cut-off. Se vengono rilevate più mutazioni per un campione, possono essere indicate tutte nel report.

Mutazione non rilevata

L'amplificazione nel canale verde (FAM) è positiva e il valore ΔC_T è superiore al valore di cut-off.

L'amplificazione del canale verde (FAM) è negativa e l'amplificazione del canale giallo (HEX) (controllo interno) è positiva.

Non valido

L'amplificazione del canale giallo (HEX) (controllo interno) non è valida.

L'amplificazione del canale verde (FAM) è negativa e l'amplificazione del canale giallo (HEX) (controllo interno) è negativa.

Nota: un campione può essere negativo all'amplificazione del canale giallo (HEX) in una provetta, ma positivo all'amplificazione del canale verde (FAM) in un'altra provetta. In questo caso, un risultato "mutation detected" (mutazione rilevata) nella seconda provetta può essere considerato valido, ma la specifica mutazione identificata potrebbe non essere l'unica in quel campione.

Appendice B: installazione del software *therascreen* EGFR CE Assay Package

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è concepito per l'uso con lo strumento Rotor-Gene Q MDx e un rotore a 72 pozzetti. Il software *therascreen* EGFR CE Assay Package è disponibile separatamente su CD (n° cat. 9023537). Il pacchetto di analisi include i modelli "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" e "*therascreen* EGFR CE Locked Template".

Nota: *therascreen* EGFR Assay Package è compatibile soltanto con il software RotorGene Q versione 2.3. Verificare di avere installato la versione corretta del software RotorGene Q prima di procedere all'installazione del software *therascreen* EGFR CE Assay Package. Se lo strumento Rotor-Gene Q MDx è stato fornito con una versione precedente del software, eseguire l'aggiornamento tramite download della versione 2.3 del software RotorGene Q dalla pagina del prodotto Rotor-Gene Q MDx, nella sezione "Product Resources" (Risorse del prodotto) della pagina "Operating Software" (Software operativo) del sito Web www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Procedura

1. Ordinare il CD del *therascreen* EGFR CE Assay Package (n° cat. 9023537).
2. Inserire il CD nell'unità CD del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx.
3. Se il CD si avvia automaticamente, avviare l'installazione facendo doppio clic sul file "*therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe*".

In alternativa, selezionare e avviare il file eseguibile indicato utilizzando il browser dei file sul computer collegato.

4. Viene visualizzata la procedura di installazione guidata del software *therascreen* EGFR CE Assay Package. Fare clic su "Next" (Avanti) per proseguire (Figura 41).

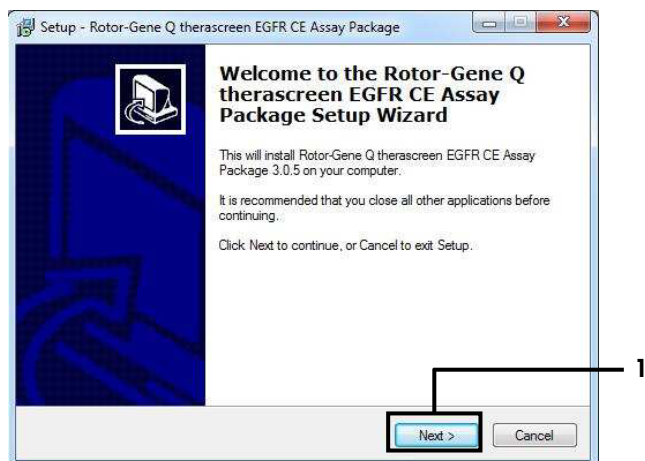


Figura 41. Finestra di dialogo "Setup Wizard" (Installazione guidata) [1 = "Next" (Avanti)].

5. Leggere il contratto di licenza nella finestra di dialogo e accettare i termini e le condizioni spuntando la casella "I accept the agreement" (Sottoscrivo il contratto). Fare clic su "Next" (Avanti) per continuare (Figura 42).

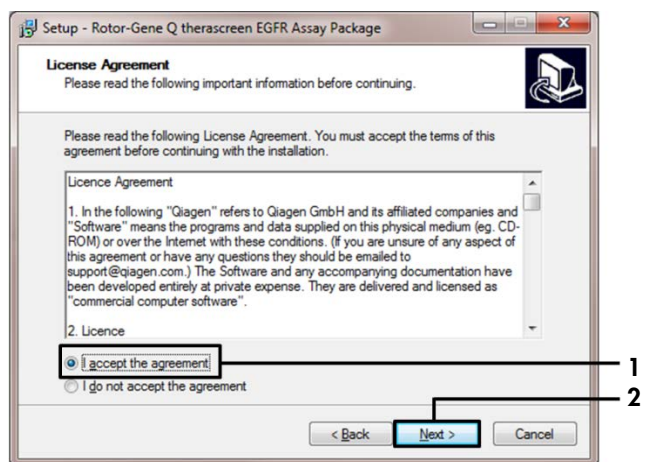


Figura 42. Finestra di dialogo "License Agreement" (Contratto di licenza). 1 = "I accept the agreement" (Sottoscrivo il contratto); 2 = "Next" (Avanti).

6. L'installazione si avvia automaticamente. Al termine dell'installazione viene visualizzata la finestra di dialogo finale "Setup Wizard" (Installazione guidata). Fare clic su "Finish" (Fine) per uscire (Figura 43).

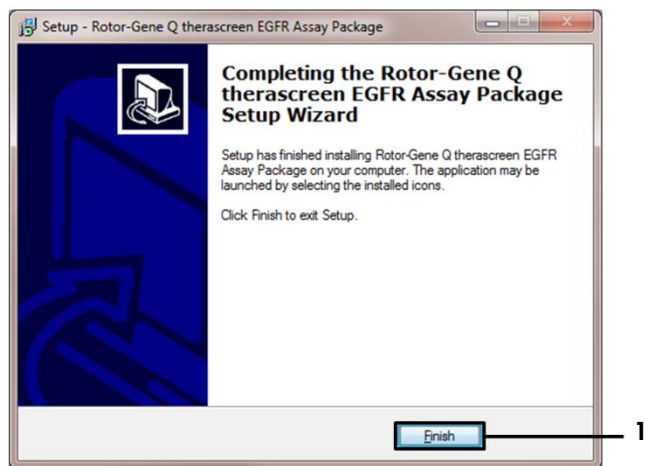


Figura 43. Completamento dell'installazione guidata [1 = "Finish" (Fine)].

7. Riavviare il computer.

Sul desktop vengono creati automaticamente i collegamenti ai due modelli "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" e "therascreen EGFR CE Locked Template" (Figura 44).

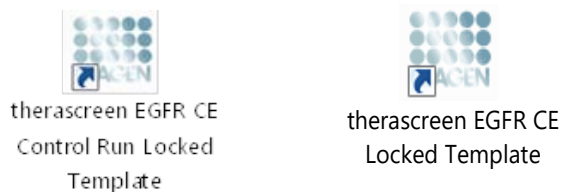


Figura 44. Icone EGFR CE Control Run Locked Template e EGFR CE Locked Template.

Informazioni di contatto

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

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° cat.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: saggio di controllo, 7 saggi di mutazione, controllo positivo, <i>Taq</i> DNA polimerasi, acqua per NTC e acqua per diluizione campioni	874111
CD <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Pacchetto di protocolli software da utilizzare con il kit <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR e con lo strumento QIAGEN Rotor-Gene Q MDx	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: colonne QIAamp MinElute®, proteinasi K, tamponi e provette di raccolta (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni: 50 colonne QIAamp MinElute, proteinasi K, tamponi e provette di raccolta (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e manodopera, installazione e addestramento	9002033

Prodotto	Contenuto	N° cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori; include 1 anno di garanzia su parti e manodopera; non include installazione e formazione.	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Blocco in alluminio per la configurazione manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo in provette da 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106

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

Cronologia delle revisioni del manuale

Documento	Modifiche	Data
HB-1909-002	Aggiornamento a valori LOD (Tabella 11) in "Caratteristiche delle prestazioni".	Giugno 2015
HB-1909-003	Aggiornamenti ad avvisi software del test (Tabella 8). Aggiornamenti a dati di riproducibilità test (Tabella 12). Aggiunta dei dati sui risultati clinici per l'IRESSA in "Caratteristiche delle prestazioni".	Agosto 2016
HB-1909-004	Modifica alla configurazione dei tempi di conservazione per chiarire il tempo di scongelamento e il tempo totale nelle "Condizioni di conservazione" e nelle Tabelle 2 e 5. Aggiornamento alla Figura 40. Diagramma di flusso dell'analisi dei campioni per la rilevazione delle mutazioni EGFR. Aggiunte informazioni per l'ordine per il kit QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue (n° cat. 60404)	Marzo 2018
HB-1909-005	Aggiunto Rappresentante autorizzato (prima di copertina). Sezione dei "Simboli" aggiornata.	Gennaio 2019

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group)

Il kit *therascreen* EGFR RGQ PCR è un kit 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 pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi 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 alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo pannello e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

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

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Note

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com