

Novembre 2017

Manuale del kit *therascreen*[®] PITX2 RGQ PCR



Versione 1



Per l'uso diagnostico in vitro

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

Per l'uso con il kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue

Per l'uso con il kit EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite



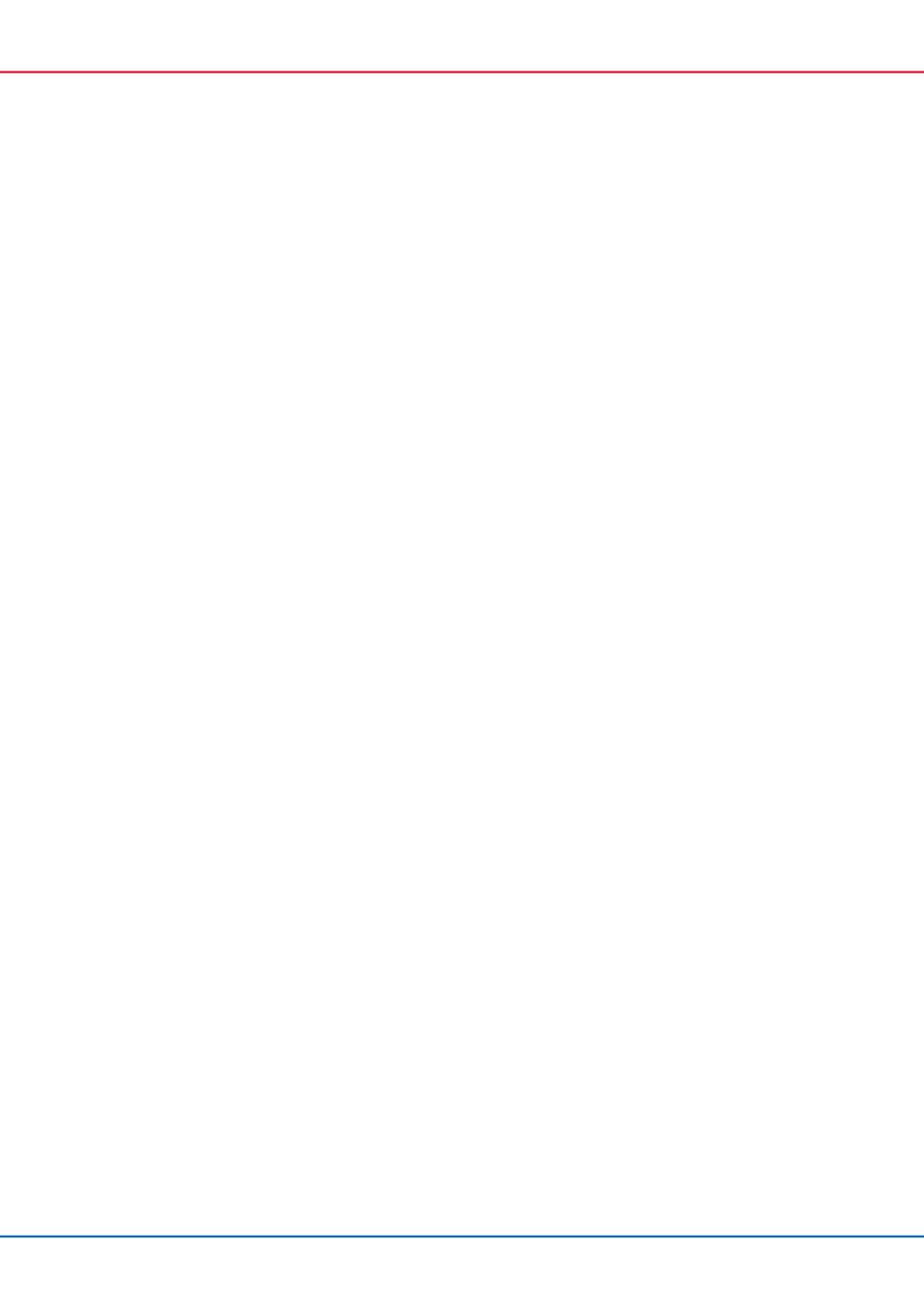
873211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA



R1 1107245IT



Sommario

Uso previsto	5
Riepilogo e spiegazione	5
Principio della procedura	6
Materiali in dotazione	12
Contenuto del kit	12
Materiale necessario ma non fornito	12
Avvertenze e precauzioni	15
Informazioni per la sicurezza	15
Precauzioni generali	16
Conservazione e manipolazione dei reagenti	19
Condizioni per la spedizione	19
Condizioni per la conservazione	19
Stabilità	19
Conservazione e manipolazione dei campioni	20
Procedura	21
Purificazione e preparazione del DNA genomico	21
Deparaffinazione delle sezioni FFPE mediante la soluzione di deparaffinazione QIAGEN	22
Purificazione manuale del gDNA con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue	25
Quantificazione del DNA	28
Conversione mediante bisolfito del gDNA con il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite	30

Protocollo: qPCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	37
Interpretazione dei risultati.....	56
Analisi dei dati.....	56
Visualizzazione dei risultati.....	60
Contrassegni.....	62
Guida alla risoluzione dei problemi.....	68
Controllo qualità.....	73
Limitazioni.....	73
Caratteristiche prestazionali.....	75
Limite del bianco.....	75
Limite di rilevazione.....	76
Volume iniziale di DNA.....	77
Linearità.....	78
Ripetibilità e riproducibilità.....	78
Sostanze interferenti.....	79
Contaminazione crociata.....	80
Finestra temporale di utilizzo.....	80
Validazione del cut-off clinico.....	81
Bibliografia.....	83
Simboli.....	85
Informazioni di contatto.....	86
Informazioni per gli ordini.....	87

Uso previsto

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è un test PCR in vitro in tempo reale specifico della metilazione destinato alla determinazione del rapporto percentuale di metilazione (PMR, percent methylation ratio) nel promotore 2 del gene homeobox pituitario 2 (PITX2). Il test utilizza gDNA bisolfito-convertito da tessuto FFPE ottenuto da pazienti a elevato rischio di tumore della mammella. Il valore di PMR sarà di aiuto ai medici nella predizione della risposta alla chemioterapia adiuvante basata su antraciclina, con o senza terapia endocrina, in pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con linfonodi positivi, recettori degli estrogeni positivi e HER2 negativi.

Il prodotto è destinato all'uso da parte di personale qualificato, quali tecnici di laboratorio e medici, con formazione relativa alle tecniche di biologia molecolare e alle procedure di diagnostica in vitro.

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR viene utilizzato in combinazione con la piattaforma QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM.

Riepilogo e spiegazione

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è utilizzato per la purificazione di DNA da tessuto FFPE. Il PITX2 (homeobox pituitario 2) è un fattore di trascrizione indotto dal percorso di trasmissione dei segnali della Wnt/ β -catenina. Il PITX2 agisce come un attuttore della trasmissione dei segnali della Wnt reclutando la β -catenina e interagendo con essa per aumentare l'espressione dei geni target coinvolti nella proliferazione e migrazione delle cellule, nella progressione del tumore e nella chemiosensibilità (1-6). L'attività di espressione genica di PITX2 è regolata dalla metilazione all'interno della regione del relativo promotore mediante la cosiddetta "modificazione epigenetica". Piccole molecole, i cosiddetti "gruppi metilici" sono attaccati alla base citosina del DNA nella regione del promotore di un gene. L'attività

di tale gene completamente o parzialmente metilato viene sottoregolata. Nel tumore della mammella, è stato segnalato che il PITX2 è sia un marker prognostico che un marker predittivo per la risposta alla chemioterapia endocrina o basata su antraciclina. Numerosi studi clinici hanno dimostrato una forte correlazione statistica tra le metilazione nella regione del promotore del gene PITX2 e misure del risultato clinico quali la sopravvivenza senza progressione, la sopravvivenza senza metastasi, la sopravvivenza senza malattia e la sopravvivenza complessiva (7-12).

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è un dosaggio in tempo reale specifico della metilazione basato su PCR (qMSP). Il tipo di campione utilizzato è il bisDNA, cioè DNA genomico (gDNA) bisolfito-convertito. Il gDNA viene prima purificato a partire da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) ottenuto da pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con linfonodi positivi, recettori degli estrogeni positivi e HER2 negativi. Dopo esposizione al bisolfito per distinguere tra PITX2 metilato e non metilato, il rapporto percentuale di metilazione (PMR) viene quantificato per tre motivi CpG del promotore 2 del gene PITX2 mediante qMSP e calcolato dal software Rotor-Gene AssayManager® con plug-in Gamma e profilo di dosaggio PITX2. Il valore di PMR ottenuto fornirà informazioni ai medici curanti riguardo alla probabilità di risposta del paziente alla chemioterapia basata su antraciclina. Se il valore di PMR ottenuto è pari o inferiore a 12, è probabile che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina. Se viceversa il valore di PMR ottenuto è superiore a 12, si potrebbe proporre un trattamento alternativo, in quanto la probabilità che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina è minore (vedere "Validazione del cut-off clinico", pagina 81).

Principio della procedura

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR utilizza la PCR in tempo reale (qPCR) per la determinazione del rapporto percentuale di metilazione (percent methylation ratio, PMR) nel promotore 2 del gene PITX2. Il tipo di campione utilizzato con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è il gDNA bisolfito-convertito. Questa conversione mediante bisolfito viene effettuata utilizzando il kit

EpiTect Fast DNA Bisulfite (QIAGEN, n. cat. 59824 o 59826). Il gDNA utilizzato per la conversione viene purificato a partire da tessuto FFPE ottenuto da pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella mediante il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n. cat. 60404). Il flusso di lavoro è rappresentato nella Figura 1.

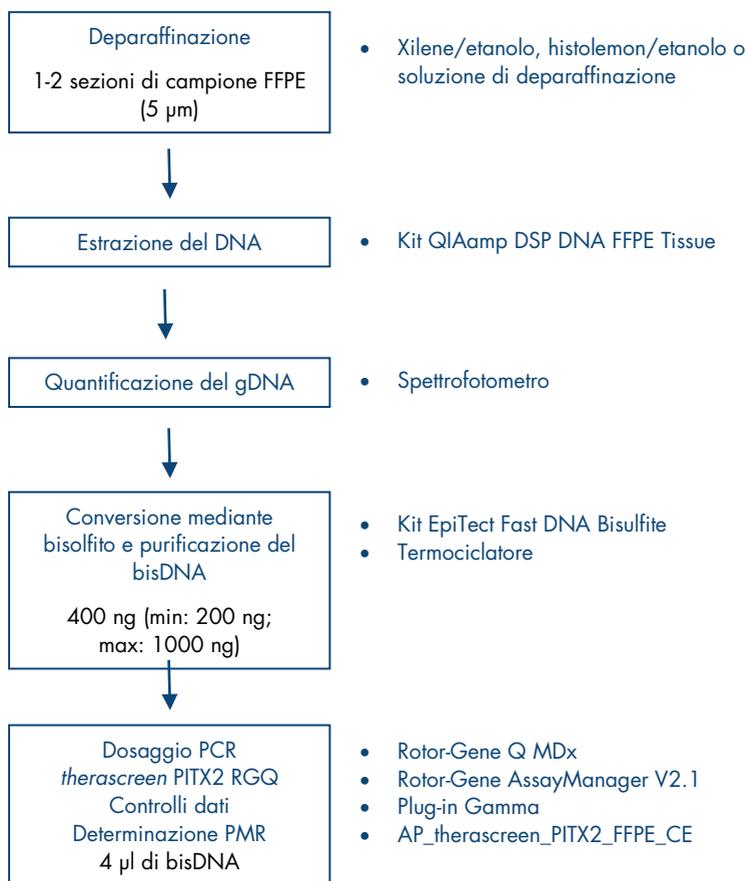


Figura 1. Flusso di lavoro per il kit *theascreen* PITX2 RGQ PCR.

L'utilizzo del valore qPCR permette di rivelare in modo accurato una sequenza di bisDNA target durante la fase esponenziale del processo di amplificazione. I dati di qPCR possono essere ottenuti rapidamente, senza elaborazione post-PCR, mediante la rivelazione in tempo reale dei segnali fluorescenti durante il ciclo di PCR.

Il dosaggio effettuato con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sfrutta il principio della qPCR con idrolisi dell'oligonucleotide delle sonde TaqMan® in combinazione con primer non specifici della metilazione (Figura 2, pagina seguente). Questo dosaggio utilizza una coppia di primer che amplificano tutte le sequenze target bisolfito-convertite. Da questa amplificazione si ottengono due differenti segnali utilizzando due sonde TaqMan marcate con fluorocromi differenti. Queste sonde, costituite da oligonucleotidi marcati mediante un fluorocromo reporter 5' (FAM™ o HEX™) e un quencher downstream 3' privo di fluorocromo, ibridizza sulla sequenza target nel prodotto della PCR. Una sonda è specifica per le sequenze di bisDNA da sequenze metilate, marcate mediante fluorocromo FAM. L'altra è specifica per le sequenze di bisDNA da sequenze non metilate, marcate mediante fluorocromo HEX. L'analisi con la qPCR di tipo TaqMan sfrutta l'attività di esonucleasi 5'→ 3' della DNA polimerasi di *Thermus aquaticus* (*Taq*). Quando la sonda è intatta, la vicinanza tra il fluorocromo reporter e il quencher determina la soppressione della fluorescenza del reporter, principalmente per un trasferimento di energia di tipo Förster. Se durante la PCR il target di interesse è presente, entrambi i primer diretti e inversi (Forward/Reverse) si appaiano in modo specifico e affiancano la sonda appaiata. L'estremità 3' della sonda è bloccata per impedire l'estensione della sonda durante la PCR (Figura 3, pagina 11). Nella fase di polimerizzazione, l'attività di esonucleasi 5'→ 3' della DNA polimerasi scinde la sonda liberando il quencher e determinando l'emissione del segnale di fluorescenza del reporter. I frammenti della sonda vengono quindi allontanati dal target e la polimerizzazione del filamento prosegue. Questo processo si verifica a ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale del prodotto (Figura 3, pagina 11). L'aumento del segnale di fluorescenza viene rilevato soltanto se la sequenza target è complementare ai primer e alla sonda e viene pertanto amplificata durante la PCR. Il numero del ciclo PCR al quale la fluorescenza di una particolare reazione supera i valori di soglia predefiniti (dati da *therascreen* PITX2 Assay Package) è denominato valore di C_T.

I risultati del dosaggio effettuato con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit sono due valori di C_T , uno per FAM e uno per HEX. Dal valore del ΔC_T tra i due segnali viene calcolato un valore di PMR (Figura 2, pagina seguente). Il calcolo del valore di PMR è basato sulla seguente formula (11):

$$PMR = \frac{100}{1 + 2^{C_{T\text{FAM}} - C_{T\text{HEX}}}}$$

Il valore di PMR ottenuto fornirà informazioni ai medici curanti riguardo alla probabilità di risposta del paziente alla chemioterapia basata su antraciclina. Se il valore di PMR ottenuto è pari o inferiore a 12, è probabile che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina. Se viceversa il valore di PMR ottenuto è superiore a 12, si potrebbe proporre un trattamento alternativo, in quanto la probabilità che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina è minore.

L'esecuzione di tutte le attività, dalla purificazione del gDNA all'analisi dei dati, richiede meno di due giornate di lavoro.

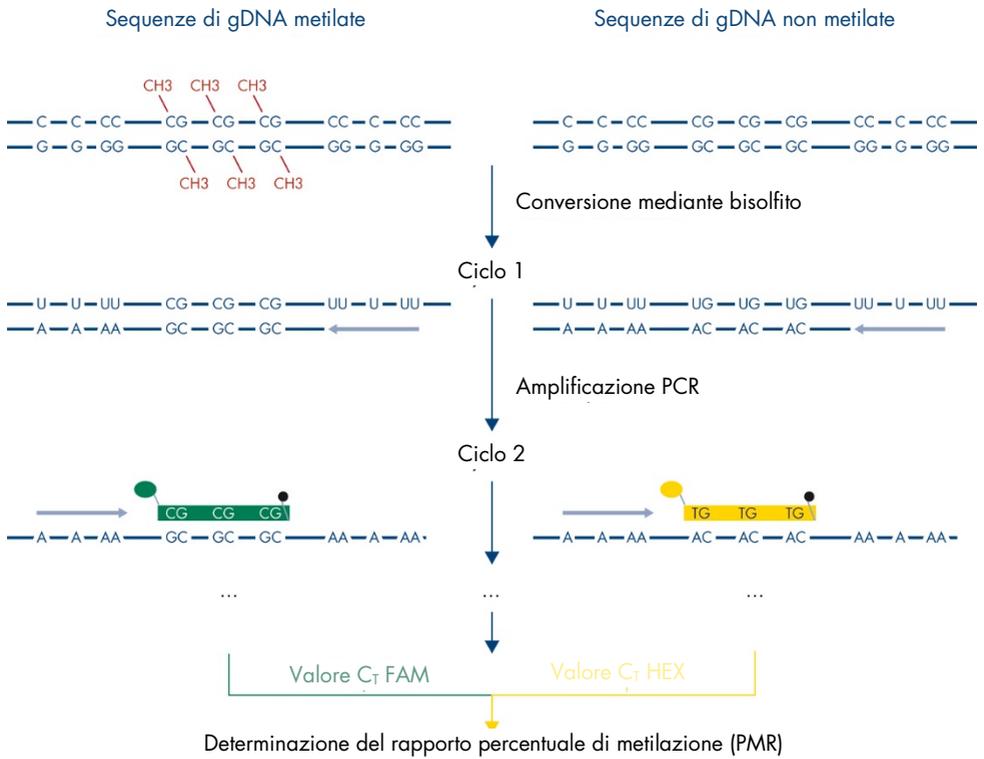


Figura 2. Principio del dosaggio mediante kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

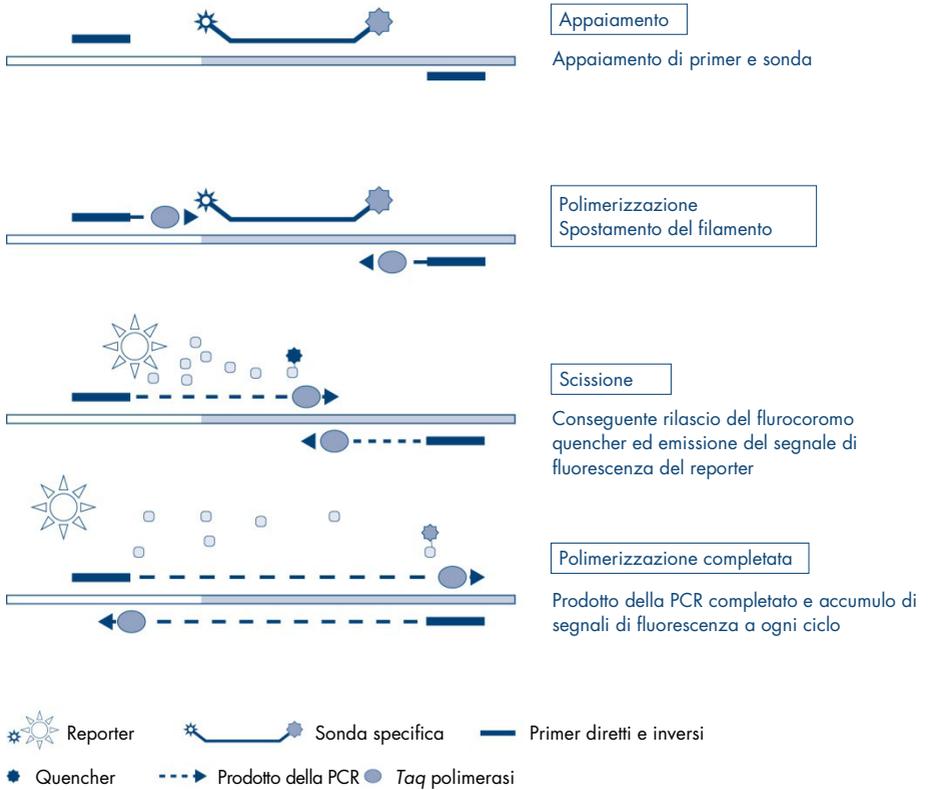


Figura 3. Principio del dosaggio di PCR in tempo reale TaqMan.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

therascreen PITX2 RGQ PCR Kit		(8)
N° di catalogo		873211
N° di reazioni		8
Viola	PITX2 RGQ PCR Master Mix (Miscela PITX2 RGQ PCR Master Mix)	660 µl
Blu	PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (Miscela PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix)	192 µl
Giallo	PITX2 RGQ PCR Reference 50 (Riferimento 50 PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Arancione	PITX2 RGQ PCR Reference Low (Riferimento basso PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Verde	PITX2 RGQ PCR Negative Control (Controllo negativo PITX2 RGQ PCR)	12 µl
Incolore	PITX2 RGQ PCR NTC (Controllo senza template PITX2 RGQ PCR)	12 µl
–	Instructions For Use (manuale, in inglese)	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 (safety data sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore. Assicurarsi che tutti i reagenti dei kit non siano scaduti e siano stati trasportati e conservati in condizioni idonee.

Reagenti

- Etanolo (grado molecolare 96-100%)

Nota: non utilizzare alcol denaturato, che contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

Strumentazione

- Termomiscelatore, incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, blocco riscaldante o bagnomaria in grado di sostenere un'incubazione a 56°C e a 90°C.

Nota: tenere conto dei requisiti relativi alla forma delle provette del termomiscelatore per la scelta della dimensione appropriata delle provette (ad es. provette da 2 o 1,5 ml)

- Pipette regolabili* dedicate per la PCR (1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)
Si consiglia di utilizzare almeno due set di pipette: uno per la preparazione e la distribuzione delle miscele di reazione di PCR e uno per la gestione del bisDNA e dei controlli, incluso il caricamento del template della PCR.
- Puntali per pipette per PCR privi di nucleasi, resistenti agli aerosol, sterili, dotati di filtri idrofobici (i puntali per pipette con barriere anti aerosol sono raccomandati per prevenire la contaminazione crociata).
- 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (Provette per microcentrifuga da 1,5 ml o 2 ml) (provette da 1,5 ml, disponibili presso Eppendorf, n. cat. 0030120.086 oppure Sarstedt, n. cat. 72.690).
- Centrifuga da tavolo con rotore per provette di reazione da 0,5 ml, 1,5 ml e 2,0 ml (in grado di raggiungere 20.000 x g).
- Agitatore Vortex.
- Spettrofotometro, ad es. lo strumento NanoDrop® oppure QIAxpert® (plug-in QIAamp: misurazione dell'acido nucleico totale)†.

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

† Elenco dei fornitori incompleto.

- Guanti monouso.

Reagenti opzionali per il controllo del flusso di lavoro.

- One vial containing one section (15 or 20 μm) of KRAS G13D Reference Standard (Un vial contenente una sezione (15 o 20 μm) di standard di riferimento KRAS G13D) (Horizon Discovery, n. cat. HD216).

Per la purificazione manuale del DNA

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue) (n. cat. 60404).
- Deparaffinization Solution (Soluzione di deparaffinazione) (n. cat. 19093) oppure xilene o histolemon (Carlo Erba, n. cat. 454911).

Importante: la soluzione di deparaffinazione, lo xilene e l'histolemon non sono forniti con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue e devono essere ordinati separatamente.

Materiale aggiuntivo per la conversione mediante bisolfito

- EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Kit EpiTect Fast DNA Bisulfite) (n. cat. 59824 o 59826).
- Provette di reazione da 0,2 ml o strisce a 8 pozzetti.
- Provette da 0,2 ml per microcentrifuga
- Termociclatore con coperchio riscaldato (poiché la reazione con bisolfito non è ricoperta con olio minerale, soltanto i termociclatori con coperchio riscaldato sono indicati per questa procedura).

Per la PCR su Rotor Gene Q MDx

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n. cat. 9002032) e accessori inclusi
- Software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1.x (dove x = 0 o superiore)
- Plug-in Gamma versione 1.0.x (dove x = 0 o superiore) per Rotor-Gene AssayManager v2.1
- Profilo di dosaggio therascreen_PITX2_FFPE_CE versione 1.0.x (dove x = 1 o superiore)

- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (Blocco di caricamento per provette 72x 0,1 ml) (n. cat. 9018901)
- 72-Well Rotor (Rotore con 72 pozzetti) (n. cat. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (Anello di bloccaggio per rotore con 72 pozzetti) (n. cat. 9018904)
- Rotor Holder (Supporto per rotore) (n. cat. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (Strisce di provette e tappi da 0,1 ml per Rotor-Gene Q MDx) (n. cat.981103 o 981106)
- Ghiaccio (o blocco refrigerante)

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Informazioni per la sicurezza

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

Per le informazioni sulla sicurezza relative alla soluzione di deparaffinazione, allo xilene-etanolo, all'histolemon-etanolo, al kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o al kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, fare riferimento ai rispettivi manuali. Per le informazioni sulla sicurezza relative agli strumenti, fare riferimento ai rispettivi manuali utente.

Precauzioni generali

L'uso dei test qPCR richiede il rispetto delle buone pratiche di laboratorio, incluse la tracciabilità, la manutenzione dell'attrezzatura dedicata alla biologia molecolare e la conformità ai regolamenti e agli standard pertinenti.

Questo kit è destinato all'uso nella diagnostica in vitro. Le istruzioni e i reagenti forniti nel kit sono stati verificati per garantire prestazioni ottimali.

- 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.
- Smaltire i campioni e i rifiuti prodotti dai test nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I reagenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sono diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti, in quanto ciò potrebbe provocare una perdita a livello di prestazioni.
- Non utilizzare volumi di reazione (miscela di reazione più campione) inferiori o superiori a 20 µl.
- Le procedure QIAGEN per il controllo della qualità prevedono un collaudo funzionale dei kit prima del rilascio in commercio di ogni singolo lotto. Evitare pertanto di miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi per non compromettere le prestazioni del test.
- L'intero flusso di lavoro di *therascreen* PITX2 richiede il trasferimento dei campioni in differenti provette, quindi occorre assicurarsi che la tracciabilità dei campioni sia correttamente mantenuta a ogni passaggio.

- Assicurarsi che siano stati installati il profilo di dosaggio PITX2 e il plug-in Gamma di Rotor-Gene AssayManager v2.1 necessario.
- Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure, consultare il Rotor-Gene Q MDx User Manual (*Manuale utente di Rotor-Gene Q MDx*) e il Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual (*Manuale utente dell'applicazione core di Rotor-Gene AssayManager v2.1*).
- In caso di alterazione dei tempi e delle temperature di incubazione, i dati generati potrebbero essere erronei o discordanti.
- Scongelare tutti i componenti di *therascreen* PITX2 RGQ PCR e i campioni in un frigorifero, su ghiaccio, su un blocco di raffreddamento oppure a temperatura ambiente per il tempo necessario.

Nota: In caso di scongelamento a temperatura ambiente, verificare periodicamente se il materiale si è scongelato, specialmente nel caso della miscela PITX2 RGQ PCR Master Mix (MMx), in quanto contiene dNTP che sono sensibili alla temperatura.

Nota: La miscela PPM PITX2 RGQ PCR deve essere protetta dalla luce in quanto contiene nucleotidi marcati con fluorocromi.

Nota: Occorre evitare di scongelare e congelare ripetutamente i materiali, non superando il limite massimo di quattro cicli di congelamento-scongelo.

- Preparare tutte le reazioni (miscela di reazione più campione) in ghiaccio o in un blocco refrigerante.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Le miscele di reazione potrebbero alterarsi in caso di esposizione alla luce.
- Non ingerire alcun reagente.
- Utilizzare singole pipette dedicate per la preparazione delle miscele di reazione e per l'aggiunta dei templati.
- Non aprire lo strumento Rotor-Gene Q MDx finché l'analisi non è terminata.
- Non aprire le provette Rotor-Gene Q MDx al termine dell'analisi. Smaltire le provette usate nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

- Procedere con cautela per assicurare il corretto svolgimento dei test sui campioni, con particolare attenzione all'inserimento errato dei campioni, agli errori di caricamento e agli errori di pipettatura.
- Gestire i campioni in modo sistematico per assicurarne la corretta identificazione.
- Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione della miscela di reazione con i materiali contenuti nei reagenti di controllo del riferimento 50 PITX2 RGQ PCR e del riferimento basso PITX2 RGQ PCR.
- Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione da carryover del DNA o del prodotto della PCR, che genererebbe un segnale falso-positivo.
- Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione da DNasi, che può determinare la degradazione del DNA template.

Si consiglia quindi quanto segue:

- Utilizzare materiale da laboratorio (ad es. pipette, puntali per pipetta, provette di reazione) privo di nucleasi e indossare guanti monouso durante l'esecuzione del test.
- Utilizzare puntali per pipetta nuovi e resistenti alla contaminazione da aerosol durante tutte le fasi di pipettatura per evitare fenomeni di contaminazione crociata dei campioni e dei reagenti.

Preparare la soluzione di reazione di PCR con materiale (pipette, puntali e così via) dedicato, in un'area riservata dove non vengano introdotte matrici di DNA (DNA, plasmidi o prodotti della PCR). Nella stessa area, trasferire il controllo NTC PITX2 RGQ PCR nella provetta appropriata (Figura 4, pagina 40), ma chiudere la provetta dopo aver caricato tutti i restanti controlli e i campioni per valutare la contaminazione crociata. Aggiungere i campioni da testare, il riferimento 50 PITX2 RGQ PCR, il riferimento basso PITX2 RGQ PCR e il controllo negativo PITX2 RGQ PCR in un locale separato e utilizzando materiale (pipette, puntali e così via) specifico.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Condizioni per la spedizione

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR viene spedito in ghiaccio secco. Qualora uno dei componenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR non dovesse essere congelato alla consegna, o la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il tragitto, o la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento o i reagenti, contattare il servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (visitare il sito www.qiagen.com).

Condizioni per la conservazione

Alla consegna riporre immediatamente il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR in un congelatore termoregolato e conservarlo tra -30°C e -15°C al riparo dalla luce.

Per le informazioni relative alla conservazione e alla manipolazione della soluzione di deparaffinazione, dello xilene-etanolo, dell'histolemon-etanolo, del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o del kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, fare riferimento ai rispettivi manuali.

Stabilità

Se conservato nelle condizioni specificate, il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è stabile fino alla data di scadenza indicata.

Dopo l'apertura, i reagenti possono essere conservati nella loro confezione originale tra -30°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Occorre evitare di scongelare e congelare ripetutamente i materiali, non superando il limite massimo di quattro cicli di congelamento-scongelo.

Per le informazioni relative alla stabilità della soluzione di deparaffinazione, dello xilene-etanolo, dell'histolemon-etanolo, del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue o del kit EpiTect Fast DNA Bisulfite, fare riferimento ai rispettivi manuali.

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.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è destinato all'uso con campioni di bisDNA. Il DNA purificato e bisolfito-convertito proviene da tessuto tumorale FFPE prelevato da lesioni primarie di pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con linfonodi positivi, recettori degli estrogeni positivi e HER2 negativi. Fissare i campioni di tessuti in formalina secondo il protocollo di laboratorio (normalmente si considera accettabile 10% di formalina tamponata neutra) il più rapidamente possibile dopo la rimozione chirurgica.

- Il campione di tessuto deve essere fissato in formalina al 4-10% il più rapidamente possibile dopo la rimozione chirurgica o la agobiopsia.
- Preferibilmente, utilizzare un tempo di fissazione di 14-24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano una maggiore frammentazione del DNA con conseguente riduzione delle prestazioni dei test di qPCR/qMSP).
- Disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione in paraffina (la formalina residua può inibire la digestione mediante proteinasi K).
- Occorre ritagliare dal blocchetto di paraffina sezioni dello spessore di 5 µm.
- Per sezioni che hanno un'area del tumore <math>< 100 \text{ mm}^2</math> si consiglia di trattare due sezioni insieme in modo da incrementare l'area totale del tumore fino ad almeno 100 mm².
- Etichettare, gestire e conservare i campioni tumorali, i blocchetti, le sezioni e i campioni pronti per la purificazione in modo controllato e conforme alle procedure locali.

- Trasportare e conservare i blocchetti FFPE e le sezioni a temperatura ambiente. Le sezioni possono essere utilizzate rapidamente per la purificazione del DNA.
- Il DNA purificato mediante il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue può essere conservato a breve termine a 2-8°C per un massimo di 24 ore oppure, se necessario, a lungo termine tra -30°C e -15°C.
- Il DNA bisolfito-convertito mediante il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite può essere conservato tra -30 e -15°C per almeno 9 mesi senza effetti negativi sulla qualità e sulla conversione. Sono in corso ulteriori indagini sulla conservazione a lungo termine. Per maggiori informazioni, contattare QIAGEN.
- La sezione di standard di riferimento KRAS G13D (Horizon Discovery, n. cat. HD216) per il controllo del flusso di lavoro può essere conservata a temperatura ambiente per 36 mesi a partire dalla data di produzione.

Procedura

Purificazione e preparazione del DNA genomico

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è stato validato in combinazione con la soluzione di deparaffinazione QIAGEN (n. cat. 19093) per la deparaffinazione delle sezioni FFPE, con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n. cat. 60404) per la purificazione del gDNA e con il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n. cat. 59824 o 59826) per la conversione mediante bisolfito del gDNA.

La deparaffinazione delle sezioni FFPE può essere effettuata utilizzando la soluzione di deparaffinazione, lo xilene-etanolo oppure l'histolemon-etanolo (l'equivalenza di questi tre metodi di deparaffinazione è stata dimostrata durante lo sviluppo del prodotto).

Se si utilizza la soluzione di deparaffinazione (n. cat. 19093), iniziare con la procedura "Deparaffinazione delle sezioni FFPE mediante la soluzione di deparaffinazione QIAGEN" a pagina 22.

Se si utilizza lo xilene-etanolo o l'histolemon-etanolo, passare direttamente alla procedura "Purificazione manuale del gDNA con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" a pagina 25.

Opzionale: Per valutare se la purificazione e la conversione mediante bisolfito sono state effettuate correttamente, è possibile utilizzare un controllo del flusso di lavoro. Il controllo del flusso di lavoro validato per il flusso di lavoro del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è la sezione di standard di riferimento KRAS G13D (Horizon Discovery, n. cat. HD216).

Assicurarsi che i reagenti per la purificazione del gDNA non siano scaduti e siano stati trasportati e conservati in condizioni idonee. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Materiale di partenza

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA deve essere costituito da sezioni di tessuto FFPE appena tagliate; se necessario, le sezioni possono essere conservate a temperatura ambiente fino al giorno successivo. Come materiale di partenza per la purificazione del gDNA occorre utilizzare un massimo di due sezioni, ognuna dello spessore di 5 µm e con un'area superficiale totale superiore a 100 mm².

Deparaffinazione delle sezioni FFPE mediante la soluzione di deparaffinazione QIAGEN

IMPORTANTE: se la deparaffinazione viene effettuata con lo xilene-etanolo o l'histolemon-etanolo, passare alla procedura "Purificazione manuale del gDNA con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" a pagina 25.

Punti importanti prima di iniziare

- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15-25°C).
- Equilibrare tutti i tamponi a temperatura ambiente; equilibrare la soluzione di deparaffinazione tra 20 e 25°C.
- La soluzione di deparaffinazione non è fornita con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue e deve essere ordinata separatamente.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Preriscaldare un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato a 56°C per utilizzarlo nelle fasi 4 e 8. Se non si ha a disposizione un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, è possibile utilizzare in alternativa un blocco riscaldante o un bagno termico.
- Se il tampone AL o il tampone ATL contengono del precipitato, scioglierlo riscaldandoli a 70°C e agitando delicatamente.
- Assicurarsi che il tampone AW1 e il tampone AW2 siano stati preparati secondo le istruzioni riportate nel *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook (Manuale del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue)*.

Procedura (per un massimo di due sezioni)

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione. Tagliare in sezioni dello spessore di 5 µm.
Nota: Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2-3 sezioni.
2. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml o 2 ml (non fornita).
3. Aggiungere 160 µl di soluzione di deparaffinazione e agitare vigorosamente in Vortex per 10 secondi.
Centrifugare brevemente affinché il campione si depositi sul fondo della provetta.

4. Incubare a 56°C per 3 minuti e quindi lasciare raffreddare a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Aggiungere 180 µl di Tampone ATL e miscelare mediante agitatore Vortex.
6. Centrifugare per 1 minuto a 11.000 x g (10.000 rpm). Si presentano due fasi (blu e trasparente).
7. Aggiungere 20 µl di proteinasi K alla fase inferiore trasparente attraversando la fase superiore con la pipetta. Miscelare delicatamente pipettando verso l'alto e verso il basso.
8. Incubare a 56°C ± 3°C per un tempo ≥ 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).
9. Incubare a 90°C ± 5°C per 1 ora ± 5 minuti.

L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte della formaldeide. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA.

Nota: Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente (15-25°C) dopo l'incubazione a 56°C della fase 8 finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C per la fase 9.

10. Centrifugare brevemente la provetta da 1,5 ml per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
11. Trasferire la fase inferiore trasparente in una nuova provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).

Nota: Non trasferire in alcun modo la fase blu.

12. Continuare con la fase 14 di "Purificazione manuale del gDNA con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue" a pagina 25.

Purificazione manuale del gDNA con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

La purificazione manuale del gDNA viene effettuata mediante il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n. cat. 60404) secondo le istruzioni riportate nel *Manuale del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit Handbook)*.

Punti importanti prima di iniziare

- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15-25°C).

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Equilibrare tutti i tamponi a temperatura ambiente.
- Impostare un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato a 56°C per utilizzarlo nella fase 12.
- Se non si ha a disposizione un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, è possibile utilizzare in alternativa un blocco riscaldante o un bagno termico.
- Se il tampone AL o il tampone ATL contengono del precipitato, scioglierlo riscaldandoli a 70°C e agitando delicatamente.
- Assicurarsi che il tampone AW1 e il tampone AW2 siano stati preparati secondo le istruzioni riportate nel *Manuale del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue*.

Procedura

Nota: Se si utilizza la soluzione di deparaffinazione QIAGEN, le fasi da 1 a 14 devono essere sostituite dalla procedura descritta in “Deparaffinazione delle sezioni FFPE mediante la soluzione di deparaffinazione QIAGEN” a pagina 22.

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione.
2. Tagliare 1 o 2 sezioni dello spessore di 5 µm in modo da ottenere almeno 100 mm² di superficie tumorale (vedere “Materiale di partenza”, pagina 22).

- Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2-3 sezioni.
3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da 1,5 o 2 ml (non fornita).
 4. Aggiungere 1 ml di xilene o di histolemon al campione. Chiudere il coperchio e agitare vigorosamente in Vortex per un tempo ≥ 10 secondi.
 5. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti ± 30 secondi a temperatura ambiente.
 6. Rimuovere il surnatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
 7. Aggiungere 1 ml di etanolo (96-100%) al pellet e miscelare mediante agitatore Vortex. L'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione.
 8. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti ± 30 secondi a temperatura ambiente.
 9. Rimuovere il surnatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
Rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile.
 10. Aprire la provetta e incubare a 15 -40°C. Incubare per 10 minuti ± 1 minuto o finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato.
 11. Risospendere il pellet in 180 μ l di tampone ATL. Aggiungere 20 μ l di proteinasi K e miscelare mediante agitatore Vortex.
 12. Incubare a 56°C ± 3 °C per un tempo ≥ 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).
 13. Incubare a 90°C ± 5 °C per 1 ora ± 5 minuti.
L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte della formaldeide. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.
 14. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
- Nota:** Se si utilizza la soluzione di deparaffinazione, continuare con la fase 15.

15. Aggiungere 200 µl di tampone AL al campione e mescolare accuratamente mediante agitatore Vortex. Quindi aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) e mescolare di nuovo accuratamente mediante agitatore Vortex.

È essenziale che il campione, il tampone AL e l'etanolo vengano miscelati immediatamente e accuratamente mediante agitatore Vortex o utilizzando una pipetta per ottenere una soluzione omogenea. Il tampone AL e l'etanolo possono essere premiscelati e quindi aggiunti insieme in un'unica fase per risparmiare tempo quando si trattano più campioni. Al momento dell'aggiunta del tampone AL e dell'etanolo può formarsi un precipitato di colore bianco. Questo precipitato non interferisce con la procedura QIAamp.

16. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

17. Trasferire con attenzione l'intero lisato nella colonna QIAamp MinElute® (in una provetta di raccolta da 2 ml) senza bagnare il bordo, chiudere il coperchio, quindi centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di raccolta pulita da 2 ml (in dotazione) e gettare la provetta di raccolta contenente il flow-through.

Se il lisato non è ancora passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione, centrifugare di nuovo a velocità più elevata fino a che la colonna QIAamp MinElute non sia vuota.

18. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone AW1 senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di raccolta pulita da 2 ml (in dotazione) e gettare la provetta di raccolta contenente il flow-through.

19. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone AW2 senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di raccolta pulita da 2 ml (in dotazione) e gettare la provetta di raccolta contenente il flow-through.

Occorre evitare che la colonna QIAamp MinElute e il flow-through entrino in contatto. Alcuni rotori di centrifuga possono vibrare in fase di decelerazione, facendo sì che il flow-through, contenente etanolo, entri in contatto con la colonna QIAamp MinElute. Quando si

rimuovono la colonna QIAamp MinElute e la provetta di raccolta dal rotore, prestare attenzione che il flow-through non entri in contatto con la colonna QIAamp MinElute.

20. Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per un tempo ≥ 3 secondi per asciugare completamente la membrana.

Questa fase è necessaria poiché la contaminazione da carryover di etanolo nell'eluato potrebbe inibire le reazioni di qPCR effettuate.

21. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml (in dotazione) pulita e gettare la provetta di raccolta contenente il flow-through. Aprire con cautela il coperchio della colonna QIAamp MinElute e aggiungere 50 μ l di tampone ATE nel centro della membrana.

22. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (15-25°C) per 5 minuti.

Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per un tempo ≥ 1 minuto.

Quantificazione del DNA

Il tampone ATE utilizzato per l'eluizione nei kit di purificazione del gDNA contiene azoturo di sodio come conservante. L'azoturo di sodio assorbe a 260 nm, pertanto è necessario eseguire una misurazione del bianco con il tampone ATE per calibrare lo spettrofotometro.

La concentrazione del DNA viene determinata misurando l'assorbanza a 260 nm seguendo la procedura dello strumento, utilizzando per esempio QIAxpert di QIAGEN (plug-in QIAamp: misurazione dell'acido nucleico totale) oppure uno strumento NanoDrop*. I valori di assorbanza a 260 nm dovrebbero rientrare in un intervallo compreso tra 0,1 e 1,0 per garantire la precisione. L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 50 μ g di DNA per ml ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$). La quantità totale di DNA purificato (ng) è uguale alla concentrazione del DNA (ng/ μ l) \times il volume del campione (μ l).

* Questo elenco di possibili spettrofotometri per la misurazione di OD₂₆₀ nm (densità ottica a 260 nm) è incompleto.

Nota: Se si utilizza il plug-in QIAamp, uno spettro interno del bianco del tampone ATE viene automaticamente sottratto dai valori di OD (densità ottica), quindi non occorre alcun campione aggiuntivo di bianco del tampone ATE in questa configurazione.

Idealmente la concentrazione minima di gDNA è 10 ng/µl* ma è possibile trattare campioni fino a 5 ng/µl, con il rischio di ottenere risultati non validi di tipo "Low input" (Quantità iniziale bassa).

* 10 ng/µl per ottenere una quantità iniziale di gDNA di 400 ng (quantità iniziale raccomandata) per la conversione mediante bisolfito, giacché il volume massimo di gDNA per la conversione è 40 µl.

Conversione mediante bisolfito del gDNA con il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite

Questo protocollo permette la conversione mediante bisolfito di quantità di DNA pari a 200, 400 o fino a 1000 ng (misurati mediante misurazione di OD₂₆₀ nm) in un volume fino a 40 µl. La quantità iniziale di DNA raccomandata per la reazione di conversione mediante bisolfito è di 400 ng. Tuttavia, in caso di bassa resa di DNA, è possibile utilizzare quantità iniziali di DNA ridotte fino a 200 ng e, in caso di ripetizione del test a causa di un contrassegno "Low input" (Quantità iniziale bassa) nell'analisi della qPCR (vedere "Contrassegni", pagina 62), occorre utilizzare una quantità il più possibile vicina a 1000 ng.

Nota: La quantità iniziale di gDNA è riferita alla quantificazione del gDNA mediante misurazione della OD 260 (utilizzando ad es. uno strumento NanoDrop oppure QIAxpert con plug-in QIAamp per la misurazione dell'acido nucleico totale).

Materiale di partenza

- Per il trattamento con bisolfito occorre utilizzare DNA genomico che non abbia subito alcuna precedente fase di digestione con enzimi di restrizione.

Punti importanti prima di iniziare

- Assicurarsi che i reagenti per la conversione mediante bisolfito non siano scaduti e siano stati trasportati e conservati in condizioni idonee. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Il tampone DNA Protect dovrebbe passare dal colore verde al colore blu dopo l'aggiunta della miscela DNA-bisolfito, a indicare che è stato raggiunto un livello di miscelazione sufficiente e il valore di pH corretto per la reazione di conversione mediante bisolfito; un valore di pH non corretto potrebbe avere effetti sulla fissazione del DNA convertito nella colonna.
- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15-25°C).

- La soluzione di bisolfito può essere conservata a temperatura ambiente (15-25°C) per almeno 6 mesi.
- Dopo un certo tempo di conservazione potrebbe formarsi del precipitato di colore bianco nella miscela tampone BD-etanolo. Questo precipitato non ha effetti sulle prestazioni del tampone BD. Evitare tuttavia di trasferire il precipitato nella colonna spin per DNA MinElute.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Preparare i reagenti del kit come descritto nella sezione "Preparazione dei reagenti" del EpiTect Fast Bisulfite Conversion Handbook (*Manuale del kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion*).
- Equilibrare campioni e tamponi a temperatura ambiente.
- **Opzionale:** impostare un termomiscelatore, un blocco riscaldante o un incubatore ad agitazione orbitale a 60°C per disciogliere la soluzione di bisolfito.

Manipolazione delle colonne spin per DNA MinElute

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, si rendono necessarie le seguenti precauzioni per la manipolazione delle colonne spin per DNA MinElute per evitare la contaminazione crociata tra le preparazioni dei campioni.

- Pipettare il campione o la soluzione con attenzione nella colonna spin per DNA MinElute senza bagnare il bordo della colonna. Evitare di toccare la membrana della colonna spin per DNA MinElute con il puntale della pipetta.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si raccomanda di utilizzare puntali dotati di barriere anti-aerosol.
- Aprire una sola colonna spin per DNA MinElute alla volta e fare attenzione a non generare aerosol.
- Indossare i guanti per l'intera procedura. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.

Centrifugazione

- Le colonne spin per DNA MinElute possono essere inserite nella maggior parte delle provette per microcentrifuga standard da 1,5-2 ml. È fornito un set di provette di raccolta da 2 ml per la fase di centrifugazione a secco.
- Tutte le fasi di centrifugazione devono essere effettuate a temperatura ambiente (15-25°C).
- Processare le colonne spin per DNA MinElute in una microcentrifuga.
- Chiudere sempre le colonne spin per DNA MinElute prima di collocarle nella microcentrifuga.
- Per trattare in modo efficiente più campioni in parallelo, si consiglia di riempire un rack con provette di raccolta in cui poter trasferire le colonne spin per DNA MinElute dopo la centrifugazione. Le provette di raccolta possono essere riutilizzate diverse volte.

Procedura

1. Scongela il DNA da utilizzare nelle reazioni di conversione mediante bisolfito. Assicurarsi che la soluzione di bisolfito sia completamente disciolta.

Nota: Se necessario, riscaldare la soluzione di bisolfito a 60°C e agitare in Vortex fino a sciogliere nuovamente tutti i precipitati.

Nota: Non collocare la soluzione di bisolfito disciolta su ghiaccio.

2. Preparare le reazioni di bisolfito in provette per PCR da 200 µl (non fornite) secondo le indicazioni riportate nella Tabella 1 alla pagina seguente. Aggiungere i componenti nell'ordine in cui sono elencati.

Nota: Il volume totale combinato di DNA e acqua priva di RNasi deve essere di 40 µl.

Nota: Per determinare il volume appropriato per la quantità iniziale di gDNA di interesse, utilizzare la seguente formula:

$$\text{volume di gDNA richiesto per conversione mediante bisolfito } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Quantità iniziale di interesse (ng)}}{\text{Concentrazione media del gDNA (ng}/\mu\text{l)}}$$

Nota: Quando si utilizza il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR, occorre sempre utilizzare il protocollo “Low concentration” (Bassa concentrazione) riportato nel *Manuale del kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion*, anche in caso di quantità iniziale di 1000 ng, in quanto la concentrazione del gDNA purificato da campioni FFPE è generalmente bassa.

Nota: La soluzione di bisolfito deve essere immediatamente agitata in Vortex per 5 secondi dopo l'aggiunta del tampone DNA Protect per proteggere i campioni dalla degradazione.

Tabella 1. Componenti della reazione mediante bisolfito

Componente	Volume per reazione (µl)
DNA	Variabile* (massimo 40 µl)
Acqua priva di RNasi	Variabile*
Soluzione di bisolfito	85
Tampone DNA Protect	15
Volume totale	140

* Il volume totale combinato di DNA e acqua priva di RNasi deve essere di 40 µl.

3. Chiudere le provette per PCR e miscelare immediatamente le reazioni al bisolfito accuratamente. Conservare le provette a temperatura ambiente (15-25 °C).

Nota: Il tampone DNA Protect dovrebbe passare dal colore verde al colore blu dopo l'aggiunta della miscela DNA-bisolfito, a indicare che è stato raggiunto un livello di miscelazione sufficiente e il valore di pH corretto per la reazione di conversione mediante bisolfito o per il legame del DNA alla colonna spin per DNA MinElute.

4. Effettuare la conversione del DNA mediante bisolfito utilizzando un termociclatore. Programmare il termociclatore secondo le indicazioni riportate nella Tabella 2 alla pagina seguente.

Il ciclo completo dovrebbe avere una durata di circa 30 minuti.

Nota: Se si utilizza un termociclatore che non consente di inserire il volume di reazione (140 µl), regolare lo strumento sul massimo volume impostabile.

Tabella 2. Condizioni del termociclatore per la conversione mediante bisolfito

Fase	Durata	Temperatura
Denaturazione	5 min	95°C
Incubazione	10 min	60°C
Denaturazione	5 min	95°C
Incubazione	10 min	60°C
Mantenimento	Indefinito*	20°C

* Il DNA convertito può essere lasciato nel termociclatore fino al giorno successivo senza perdita di prestazioni.

5. Collocare le provette per PCR contenenti le reazioni al bisolfito nel termociclatore. Avviare l'incubazione con termociclatore.

IMPORTANTE: Poiché la reazione al bisolfito non è ricoperta con olio minerale, soltanto i termociclatori con coperchio riscaldato sono indicati per questa procedura. È importante utilizzare provette per PCR che possono essere chiuse ermeticamente.

Nota: Il DNA convertito può essere lasciato nel termociclatore fino al giorno successivo senza perdita di prestazioni.

Purificazione del DNA bisolfito-convertito

6. Una volta completata la conversione mediante bisolfito, centrifugare brevemente le provette per PCR contenenti le reazioni al bisolfito e quindi trasferire completamente le reazioni al bisolfito in provette per microcentrifuga da 1,5 ml pulite.
Il trasferimento dei precipitati nella soluzione non ha effetti sulle prestazioni o sulla resa della reazione.

7. Aggiungere 310 µl di tampone BL a ogni campione. Miscelare la soluzione agitandola in Vortex e poi centrifugandola brevemente.
8. Aggiungere 250 µl di etanolo (96-100%) a ogni campione. Miscelare le soluzioni agitandole in Vortex in modalità pulsata per 15 secondi, quindi centrifugare brevemente per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
9. Collocare il numero necessario di colonne spin per DNA MinElute e di provette di raccolta in un rack adeguato. Trasferire l'intera miscela contenuta in ogni provetta trattata nella fase 8 nella corrispondente colonna spin per DNA MinElute.
10. Centrifugare le colonne spin a velocità massima per 1 minuto. Scartare il flow-through e ricollocare le colonne spin nelle provette di raccolta.
11. Aggiungere 500 µl di tampone BW (tampone di lavaggio) a ogni colonna spin, quindi centrifugare a velocità massima per 1 minuto. Scartare il flow-through e ricollocare le colonne spin nelle provette di raccolta.
12. Aggiungere 500 µl di tampone BD (tampone di desolfurazione) a ogni colonna spin, quindi incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (15-25°C).
Se nel tampone BD sono presenti precipitati, evitare di trasferirli nelle colonne spin.
IMPORTANTE: il flacone contenente il tampone BD deve essere chiuso immediatamente dopo l'utilizzo per evitare l'acidificazione dovuta all'anidride carbonica presente nell'aria.
Nota: È importante chiudere i coperchi delle colonne spin prima dell'incubazione.
13. Centrifugare le colonne spin a velocità massima per 1 minuto. Scartare il flow-through e ricollocare le colonne spin nelle provette di raccolta.
14. Aggiungere 500 µl di tampone BW a ogni colonna spin, quindi centrifugare a velocità massima per 1 minuto. Scartare il flow-through e ricollocare le colonne spin nelle provette di raccolta.
15. Ripetere la fase 14 una volta.
16. Aggiungere 250 µl di etanolo (96-100%) a ogni colonna spin, quindi centrifugare a velocità massima per 1 minuto.

-
17. Collocare le colonne spin in provette di raccolta nuove da 2 ml (fornite), quindi centrifugare le colonne spin a velocità massima per 1 minuto per rimuovere qualsiasi liquido residuo.
18. Collocare le colonne spin con il coperchio aperto in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml pulita (non fornita) e incubare le colonne per 5 minuti a 60°C in un blocco riscaldante. Questa fase garantisce l'evaporazione dell'eventuale liquido residuo.
19. Aggiungere 15 µl di tampone EB (tampone di eluizione) direttamente al centro della membrana di ogni colonna spin e chiudere delicatamente i coperchi.
- Nota:** Non eluire con una quantità di tampone inferiore 15 µl buffer poiché in tal caso il volume dell'eluato sarebbe troppo piccolo per procedere con la fase di qPCR.
20. Incubare le colonne spin a temperatura ambiente per 1 minuto.
21. Centrifugare per 1 minuto a 15.000 x g (12.000 rpm) per eluire il DNA.
- Nota:** Raccomandiamo di conservare il DNA purificato tra 2 e 8°C per un massimo di 24 ore. In caso di conservazione del DNA per tempi superiori a 24 ore, raccomandiamo di conservare tra -30 e -15°C.

Protocollo: qPCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR deve essere utilizzato sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* utilizzando il software Rotor-Gene AssayManager v2.1 per l'interpretazione automatizzata dei risultati.

Prima di iniziare il protocollo, acquisire dimestichezza con lo strumento Rotor-Gene Q MDx e con il software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Per maggiori informazioni, consultare i manuali utente dello strumento, del software Rotor-Gene AssayManager v2.1 e del plug-in Gamma.

Nota importante: Se è la prima volta che si utilizzano il software Rotor-Gene AssayManager v2.1, il plug-in Gamma e il profilo di dosaggio, fare riferimento alla sezione "Installazione del software Rotor-Gene AssayManager v2.1, del plug-in Gamma e importazione del profilo di dosaggio" a pagina 53 per le istruzioni relative all'installazione. Se il software Rotor-Gene AssayManager v2.1, il plug-in Gamma e il profilo di dosaggio sono già stati installati e importati nel computer, continuare con le istruzioni riportate di seguito.

Allestimento della qPCR

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR contiene i prodotti necessari per testare otto campioni in un massimo di tre analisi.

* Utilizzare possibilmente uno strumento Rotor-Gene Q 5plex HRM con data di produzione gennaio 2010 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.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Raffreddare un blocco di caricamento per 72 provette da 0,1 ml per 10 minuti in un congelatore o per almeno 1 ora a temperatura di refrigerazione.
- Scongelare tutti i componenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e i campioni in un frigorifero, su ghiaccio, su un blocco di raffreddamento oppure a temperatura ambiente per il tempo necessario.

Nota: In caso di scongelamento a temperatura ambiente, verificare periodicamente se il materiale si è scongelato, specialmente nel caso della miscela PITX2 RGQ PCR MMx, in quanto contiene dNTP che sono sensibili alla temperatura.

Nota: La miscela PPM PITX2 RGQ PCR deve essere protetta dalla luce del sole in quanto contiene nucleotidi marcati con fluorocromi.

- Collocare i prodotti scongelati su ghiaccio, su un blocco di raffreddamento oppure in un frigorifero fino a quando non saranno collocati nuovamente a una temperatura tra -30 e -15°C dopo l'uso.

Nota: Se vengono utilizzati diverse volte nel corso della stessa giornata, i componenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR possono essere mantenuti al riparo dalla luce a una temperatura compresa tra 2 e 8°C per un massimo di 6 ore.

Nota: I componenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR possono essere utilizzati per un massimo di quattro cicli di congelamento-scongelamento.

- Pulire l'area del bancone dedicata alla preparazione della miscela per la PCR, in modo da ridurre i rischi di contaminazione con stampi o nucleasi.
- Prima dell'uso, agitare le provette in Vortex (10-12 secondi) e quindi centrifugarle brevemente. Ciò non vale per PITX2 RGQ PCR MMx, che viene miscelata pipettando su e giù in quanto contiene *Taq* polimerasi.

Procedura

1. Preparare la miscela di reazione PITX2 qPCR su ghiaccio (oppure utilizzando un blocco di raffreddamento) in una provetta da 1,5 o 2 ml (non fornita) a seconda del numero di campioni da trattare.

Lo schema di pipettatura per la preparazione della miscela di reazione PITX2 mostrata nella Tabella 3 (pagina successiva) viene calcolato in modo tale da ottenere un volume finale della reazione di 20 μ l dopo l'aggiunta di 4 μ l di campione di bisDNA o di controllo. Viene incluso un volume extra per compensare gli errori di pipettatura e consentire la preparazione di una miscela di reazione sufficiente per quattro campioni testati in duplicato oltre a quattro controlli. Se i campioni testati sono di meno, la preparazione della miscela di reazione può essere modificata conseguentemente. Non dimenticare di includere un volume extra per compensare gli errori di pipettatura (un pozzetto extra per 10 pozzetti, due pozzetti extra per 20 pozzetti).

Tabella 3. Preparazione della miscela di reazione *therascreen* PITX2 RGQ PCR

Componente	1 reazione (μ l)	Esempio per una piastra a 12 pozzetti: 12+2 reazioni extra (μ l)*
PITX2 RGQ PCR Master Mix (Miscela PITX2 RGQ PCR Master Mix)	10	140
PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix (Miscela PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix)	6	84
Volume totale della miscela di reazione qPCR (μ l)	16	224
Distribuzione della miscela di reazione qPCR	16 μ l per provetta	
Distribuzione dei campioni	4 μ l per provetta	
Volume totale della reazione qPCR	20 μ l	

* È incluso un volume di reazione extra per compensare gli errori di pipettatura: un pozzetto extra per 10 pozzetti, due pozzetti extra per 20 pozzetti.

2. Agitare in Vortex (10-12 secondi) e centrifugare brevemente la miscela di reazione PITX2 qPCR. Collocare le strisce di provette qPCR su un blocco di caricamento pre-raffreddato da 72 provette ed erogare 16 μ l di miscela di reazione qPCR PITX2 in ogni provetta della striscia, seguendo l'esempio di configurazione del blocco di caricamento illustrato nella Figura 4.

Nota: Si raccomanda di erogare i 16 µl della miscela di reazione mediante pipettatura inversa.

1	REF50	9	Sample 3	17	NA	25	NA	33	NA	41	NA	49	NA	57	NA	65	NA
2	REFlow	10	Sample 3	18	NA	26	NA	34	NA	42	NA	50	NA	58	NA	66	NA
3	NC	11	Sample 4	19	NA	27	NA	35	NA	43	NA	51	NA	59	NA	67	NA
4	NTC	12	Sample 4	20	NA	28	NA	36	NA	44	NA	52	NA	60	NA	68	NA
5	Sample 1	13	NA	21	NA	29	NA	37	NA	45	NA	53	NA	61	NA	69	NA
6	Sample 1	14	NA	22	NA	30	NA	38	NA	46	NA	54	NA	62	NA	70	NA
7	Sample 2	15	NA	23	NA	31	NA	39	NA	47	NA	55	NA	63	NA	71	NA
8	Sample 2	16	NA	24	NA	32	NA	40	NA	48	NA	56	NA	64	NA	72	NA

Figura 4. Configurazione del blocco di caricamento per un esperimento con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR per il test di quattro campioni. I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore. Le posizioni dei controlli sono definite nel profilo di dosaggio PITX2 e non possono essere modificate. Se i controlli non vengono collocati nelle posizioni indicate non è possibile eseguire l'analisi automatizzata dei risultati. **REF50:** Riferimento 50 PITX2 RGQ PCR; **REFlow:** Riferimento basso PITX2 RGQ PCR; **NC:** Controllo negativo PITX2 RGQ PCR, **NTC:** Controllo senza template (NTC) PITX2 RGQ PCR; **da Sample 1 a Sample 4:** campioni di bisDNA, **NA:** pozzetto vuoto.

3. Agitare in Vortex (10-12 secondi) e centrifugare brevemente i campioni di bisDNA, il riferimento 50 PITX2 RGQ PCR (Ref50), il riferimento basso PITX2 RGQ PCR (RefLow), il controllo negativo PITX2 RGQ PCR (NC) e il controllo senza template PITX2 RGQ PCR (NTC).
4. Aggiungere 4 µl di campione o di materiale di controllo nella provetta corrispondente secondo la configurazione riportata nella Figura 4 per ottenere un volume totale di 20 µl. Miscelare delicatamente pipettando su e giù per 5 volte.

Nota: Ricordarsi di sostituire i puntali tra una provetta e l'altra per evitare risultati falsi positivi dovuti alla contaminazione con un template non specifico.
5. Chiudere tutte le provette e verificare che non vi siano bolle d'aria sul fondo.
6. Per evitare la degradazione dei materiali, riporre tutti i componenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e tutti i campioni nelle condizioni di conservazione appropriate.

Preparazione di Rotor-Gene MDx

Si raccomanda vivamente di avviare l'analisi il prima possibile dopo la preparazione; se tuttavia la piastra è stata preparata ma non è possibile avviare direttamente l'analisi (poiché lo strumento non è disponibile) è possibile conservare la piastra al riparo dalla luce a una temperatura compresa tra 2 e 8°C per un massimo di 24 ore (vedere "Finestra temporale di utilizzo", pagina 80).

7. Collocare un rotore a 72 pozzetti sul supporto del rotore dello strumento Rotor-Gene Q MDx.
8. Riempire il rotore con le strisce di provette precedentemente preparate secondo le posizioni assegnate, cominciando dalla posizione 1, come mostrato nella Figura 5.
9. Per riempire completamente il rotore, inserire provette vuote tappate nelle posizioni vuote.

Nota: Assicurarsi che la prima provetta sia inserita nella posizione 1 e che le strisce di provette siano collocate nelle giuste posizioni e con l'orientamento corretto (accorgimento importante per la validità dell'analisi e la tracciabilità dei campioni) come illustrato nella Figura 5.

Nota: Collocare sempre i quattro controlli (REF50, REFlow, NC e NTC) nelle posizioni da 1 a 4 in modo tale che l'ottimizzazione del guadagno (eseguita sulla posizione-provetta 1) venga sempre eseguita sulla stessa amplificazione. Assicurarsi che i controlli vengano caricati nell'ordine corretto per l'analisi automatizzata dei controlli (lo scambio dei controlli invaliderebbe l'analisi secondo il profilo di dosaggio PITX2).

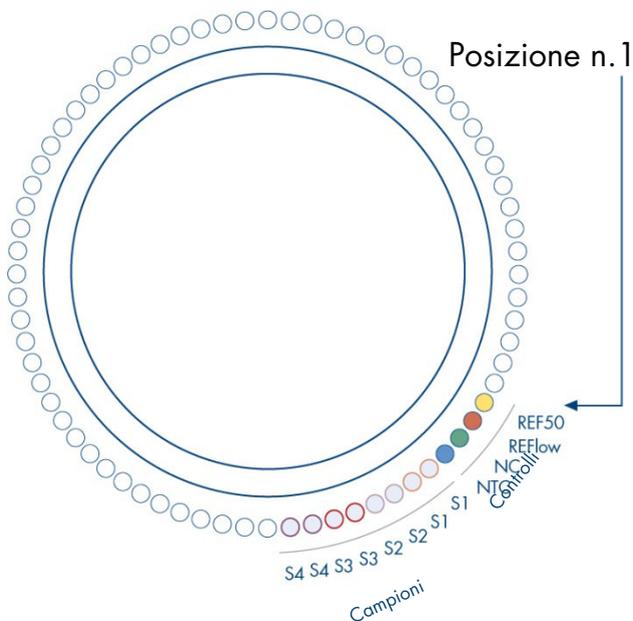


Figura 5. Configurazione del rotore per un esperimento con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. REF50: Riferimento 50 PITX2 RGQ PCR; REF50: Riferimento basso PITX2 RGQ PCR; NC: Controllo negativo PITX2 RGQ PCR, NTC: controllo senza template PITX2 RGQ PCR (NTC); da S1 a S4: campioni di bisDNA. **Nota:** Tutte le posizioni restanti (○) devono essere riempite con provette vuote.

10. Fissare l'anello di bloccaggio.

11. Caricare il rotore e l'anello di bloccaggio sullo strumento Rotor-Gene Q MDx. Chiudere il coperchio dello strumento.

Creazione di un elenco di lavoro e avvio della qPCR

Nota: L'elenco di lavoro può essere creato e salvato prima della preparazione dei campioni oppure durante la configurazione dell'esperimento nello strumento, come descritto nel presente manuale.

12. Accendere lo strumento Rotor-Gene Q MDx.

13. Aprire il software Rotor-Gene AssayManager facendo clic sull'icona: . Si apre la finestra di Rotor-Gene AssayManager (Figura 6).



Figura 6. Schermata di login di Rotor-Gene AssayManager.

14. Effettuare il login come utente con il ruolo di "Operator" (Operatore) in modalità "Closed" (Chiusa). Fare clic su "OK". Si apre la schermata di Rotor-Gene AssayManager (Figura 7, pagina seguente).

15. Prima di avviare l'analisi, verificare che RGQ sia correttamente rilevato dal software.

16. Selezionare la scheda "Setup" (Impostazione).

Nota: Le funzionalità generali dell'ambiente "Setup" e di "Creating/Editing a Work List" (Creazione/modifica di un elenco di lavoro) sono descritte nel *Manuale utente dell'applicazione core di Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

17. Fare clic su "New work list" (Nuovo elenco di lavoro) (Figura 7).

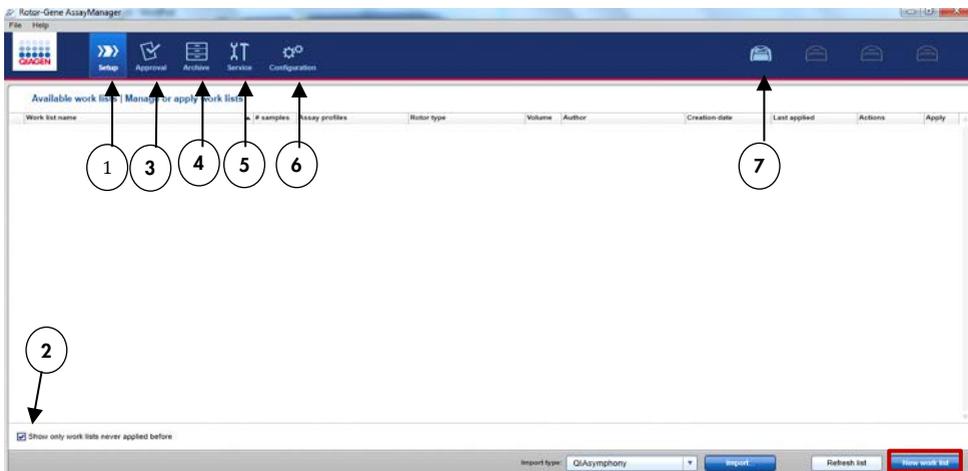


Figura 7. Descrizione delle diverse schede presenti nel software RGAM.

- | | |
|---|---|
| <p>1 Scheda "Setup" (Impostazione). Questa scheda consente di gestire o applicare gli elenchi di lavoro.</p> <p>2 Verifica degli elenchi di lavoro applicati. Mostra solo i nuovi elenchi di lavoro. Un elenco di lavoro "applicato" è già stato eseguito.</p> <p>3 Scheda "Approval" (Convalida). Questa scheda consente di trovare esperimenti precedenti.</p> <p>4 Scheda "Archive" (Archiviazione). Consente di trovare esperimenti passati che sono già stati approvati.</p> | <p>5 Scheda "Service" (Assistenza). Mostra un report di audit trail per ogni file generato dal software.</p> <p>6 Scheda "Configuration" (Configurazione). Consente la configurazione di tutti i parametri software.</p> <p>7 Icone di Rotor-Gene Q MDx (RGQ):</p> <p> Non connesso  Connesso</p> |
|---|---|

18. Selezionare il profilo di dosaggio PITX2 dall'elenco dei profili di dosaggio disponibili (Figura 8).

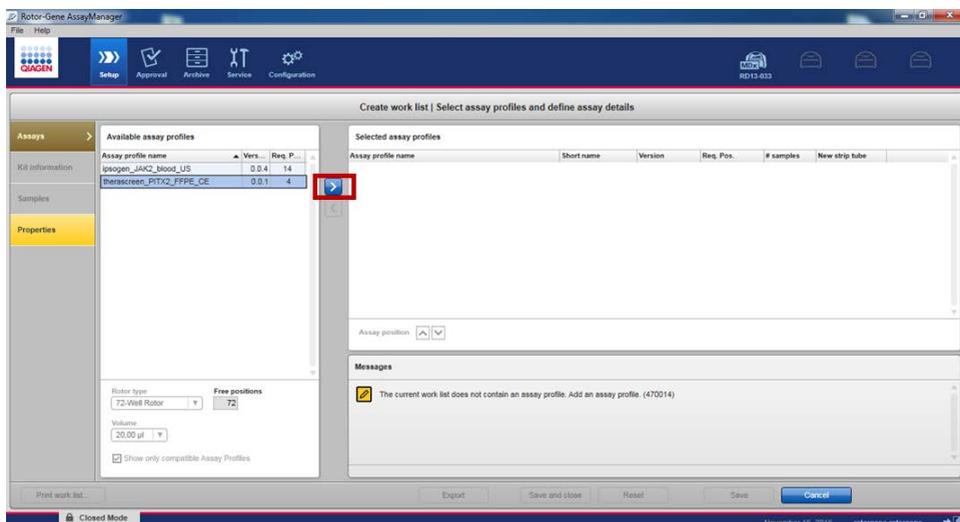


Figura 8. Importazione del profilo di dosaggio.

19. Trasferire il profilo di dosaggio selezionato all'elenco "Selected assay profiles" (Profili di dosaggio selezionati) facendo clic sulla freccia (a destra del nome del profilo di dosaggio). Il profilo di dosaggio dovrebbe a questo punto essere visualizzato nell'elenco "Selected assay profiles" (Figura 8).

20. Nella scheda "Assays" (Dosaggi), compilare i campi evidenziati in giallo "# samples" (Numero di campioni) (fino a 8) secondo la propria configurazione della piastra (Figura 9).

Nota: Il numero di campioni non corrisponde al numero di pozzetti e non include i controlli. I campioni vengono testati in duplicato, pertanto un campione corrisponde a due pozzetti. Per esempio, il numero di campioni da inserire è 4 per la piastra a 12 pozzetti rappresentata nella Figura 4 (pagina 40).

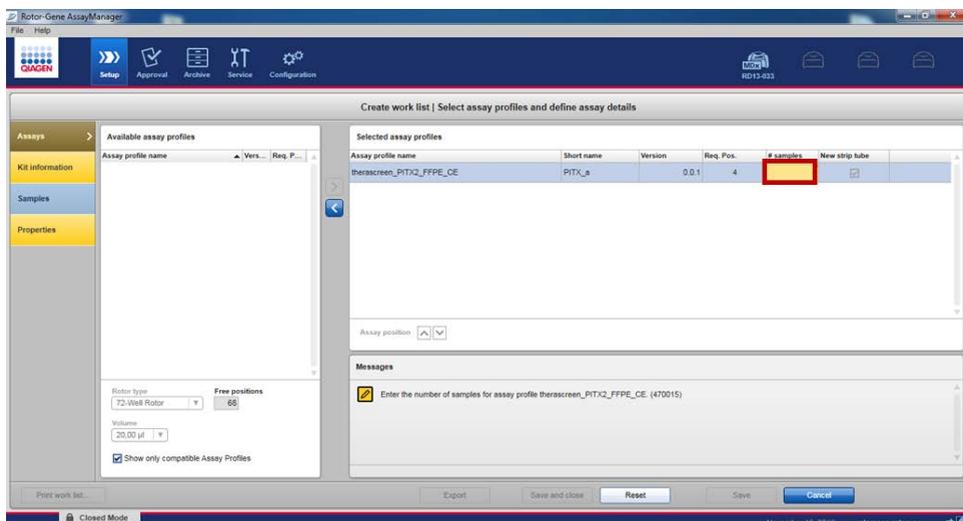


Figura 9. Inserimento del numero di campioni.

21. Selezionare la scheda “Kit Information” (informazioni kit). Inserire le informazioni sul kit selezionando l'opzione “Use kit bar code” (Utilizza il codice a barre del kit) e scansionando il codice a barre oppure selezionando l'opzione “Enter kit information manually” (Inserire le informazioni sul kit manualmente) e inserendo manualmente le informazioni sul kit riportate sull'etichetta della scatola del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR:

MAT Numero di materiale

 Data di scadenza

LOT Numero di lotto

22. Selezionare la scheda “Samples” (Campioni). Viene visualizzato un elenco con i dettagli dei campioni. L'elenco rappresenta la disposizione del rotore prevista.

23. Per ogni campione, inserire l'identificativo del campione (“Sample ID”), aggiungendo eventuali informazioni opzionali come commento (“Sample comment”) (Figura 10).

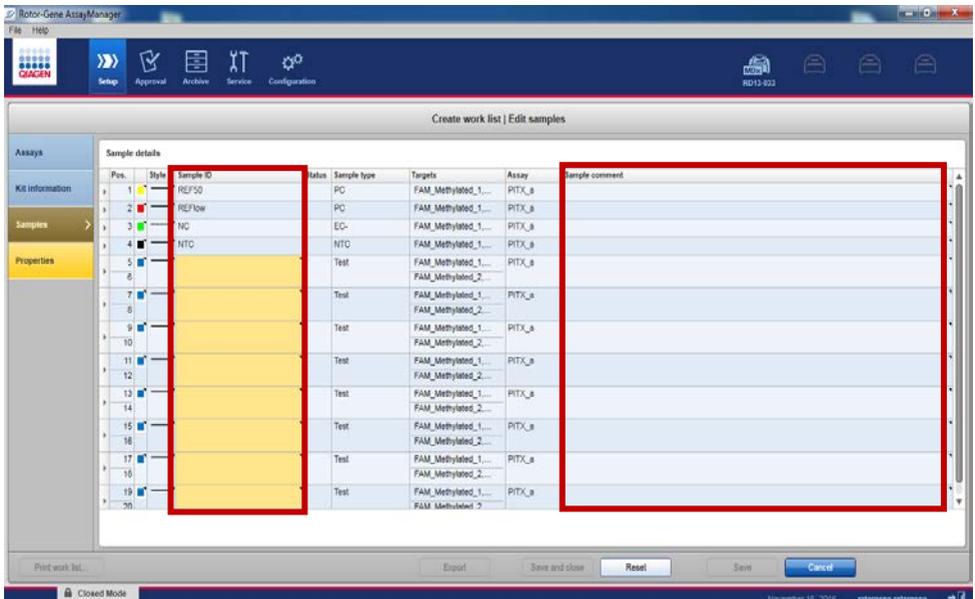


Figura 10. Impostazioni per il campione.

24. Selezionare “Properties” (Proprietà) e immettere un nome per l'elenco di lavoro (Figura 11).

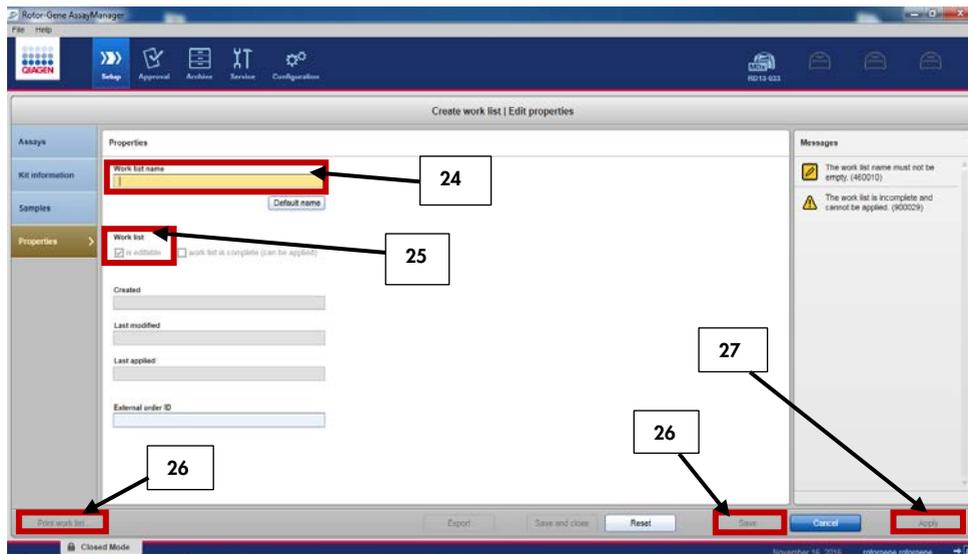


Figura 11. Creazione dell'elenco di lavoro.

25. Barrare la casella di controllo “worklist is complete (can be applied)” (Elenco di lavoro completo (può essere applicato)).

26. Salvare l'elenco di lavoro.

Opzionale: Premere “Print work list” (Stampa elenco di lavoro). La stampa dell'elenco di lavoro può essere utile per la preparazione e la configurazione dell'analisi. I dettagli sui campioni sono inclusi nell'elenco di lavoro.

27. Selezionare l'elenco di lavoro corrispondente dalla schermata di gestione degli elenchi di lavoro, quindi fare clic su “Apply” (Applica). In alternativa, se l'elenco di lavoro è ancora aperto, fare clic su “Apply”.

Nota: Prima di avviare l'analisi, verificare che Rotor-Gene Q Mdx sia correttamente rilevato dal software.

28. Specificare il nome dell'esperimento.

29. Nella sezione "Cycler Selection" (Selezione ciclatore) selezionare il ciclatore da utilizzare.

Nota: Deve essere utilizzato un ciclatore Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

30. Verificare che l'anello di bloccaggio sia collegato correttamente e confermare nella schermata selezionando la casella di controllo corrispondente.

31. Cliccare su "Start Run" (Avvia analisi). La seduta qPCR dovrebbe avviarsi.

Rilascio e report dei risultati qPCR

La funzionalità generale dell'ambiente "Approval" è descritta dettagliatamente nel Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual (*Manuale utente del plug-in Gamma di Rotor-Gene AssayManager v2.1*).

Non appena l'analisi termina e il ciclatore si sblocca, l'esperimento viene salvato nel database interno. L'analisi dei dati acquisiti viene eseguita automaticamente in base alle regole e ai parametri definiti dal profilo di dosaggio.

Nota: Per convalidare l'analisi è richiesto il ruolo utente "Approver" (Convalidatore).

1. Al termine dell'analisi, fare clic su "Finish run" (Termina analisi) per analizzare ed esportare i dati.

Nota: Finché il passaggio non è completato, l'esperimento non viene salvato nel database interno.

2. Dopo aver fatto clic su "Finish run", inserire la password e fare clic su "Release and go to approval" (Rilascia e vai alla convalida) (Figura 12).

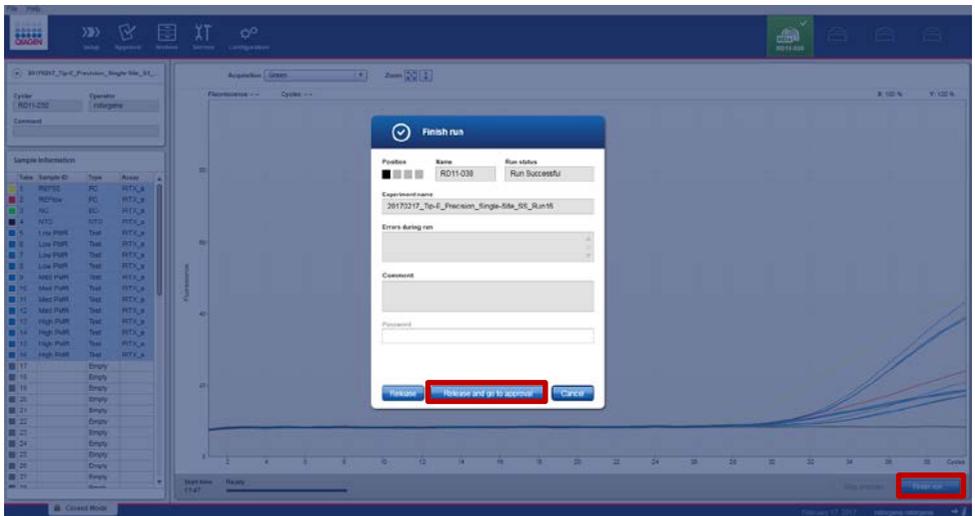


Figura 12. Finalizzazione dell'analisi.

Se si è effettuato il login con il ruolo "Approver", fare clic su "Release and go to approval".

Se si è effettuato il login con il ruolo "Operator" (Operatore), fare clic su "Release" (Rilascia).

Se si è fatto clic su "Release and go to approval", i risultati dell'esperimento vengono visualizzati nell'ambiente "Approval".

Se un utente con il ruolo di "Operator" ha fatto clic su Release, è necessario che un utente con il ruolo "Approver" esegua il login e selezioni l'ambiente "Approval".

Nota: Nella scheda "Approval" è possibile analizzare gli esperimenti passando da una scheda all'altra (cioè "Experiment" (Esperimento), "Assay" (Dosaggio), "Audit trail" (Traccia di controllo) e "Run control results" (Risultati di controllo dell'analisi).

3. Verificare le curve di amplificazione per ogni campione e barrare la prima casella alla destra della colonna "Flags" (Contrassegni); la casella diventa verde (Figura 13).

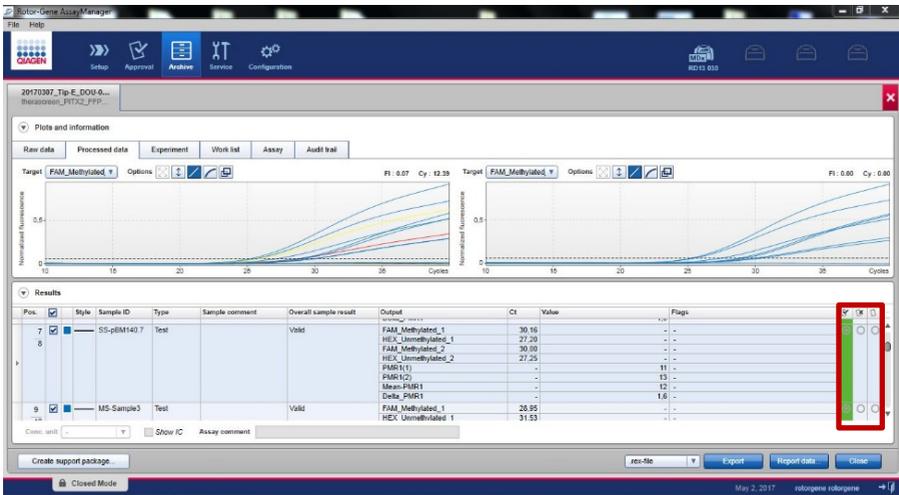


Figura 13. Verifica della curva di amplificazione.

4. Fare clic su "Release/report data" (Rilascia/referta i dati) nella parte in basso a destra della finestra per creare un report in formato .pdf e salvare il file LIMS (una copia viene automaticamente salvata in C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Reports).
5. Chiudere il file pdf e tornare a Rotor-Gene AssayManager. Fare clic su "OK" ogni volta che viene richiesto.
6. Passare alla scheda "Archive" (Archivio) per esportare il file in formato .rex. Verificare che i campi "Start date" (Data di inizio) e "End date" (Data di fine) siano corretti, quindi fare clic su "Apply filter" (Applica filtro). Selezionare l'esperimento da esportare e quindi fare clic su "Show assays" (Mostra dosaggi) (Figura 14).

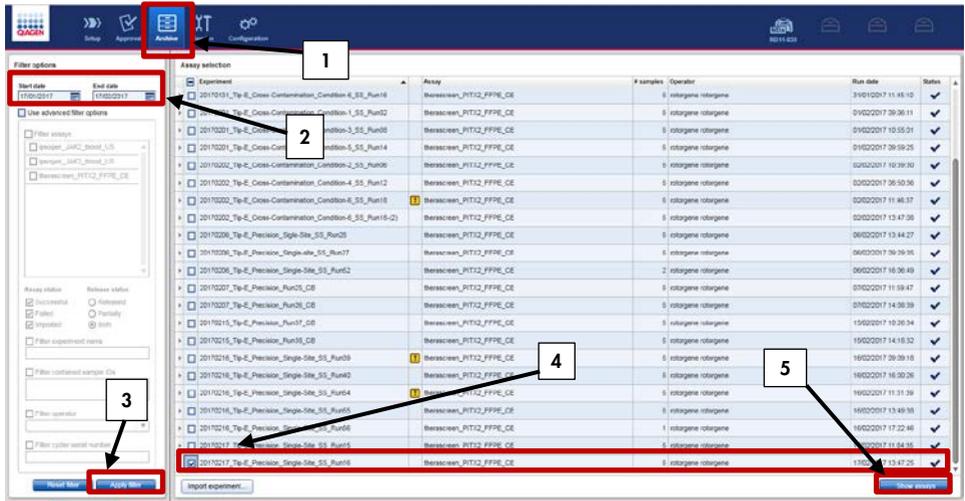


Figura 14. Esportare i dati dell'analisi.

7. Esportare il file .rex (il file viene salvato in C:\Documents and settings\AllUsers\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\Experiments).

Nota: Il software genera automaticamente un file LIMS in C:\Documents and settings\All Users\Documents\QIAGEN\RotorGeneAssayManager\Export\LIMS

8. Scaricare lo strumento Rotor-Gene Q MDx e smaltire le strisce di provette nel rispetto dei regolamenti locali sulla sicurezza.

Nota: per eventuali richieste di risoluzione dei problemi da presentare al supporto tecnico QIAGEN, servirà un pacchetto di supporto generato dall'analisi. I pacchetti di supporto possono essere generati nell'ambiente "Approval" o "Archive". Per maggiori informazioni, vedere la sezione "Creazione di un pacchetto di supporto" nel *Manuale utente dell'applicazione core di Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Oltre al pacchetto di supporto, potrebbe essere d'aiuto l'audit trail relativo al momento dell'evento ± 1 giorno. L'audit trail può essere recuperato dall'ambiente "Service". Per maggiori informazioni, consultare il *Manuale utente dell'applicazione core del Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Installazione del software Rotor-Gene AssayManager v2.1, del plug-in Gamma e importazione del profilo di dosaggio

Sul computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx è necessario installare il software Rotor-Gene AssayManager v2.1. Il software è disponibile per il download in "Operating Software" (Software operativo), scheda "Product Resources" (Risorse del prodotto), nella pagina del prodotto Rotor-Gene AssayManager v2.1: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Per informazioni sull'installazione del software core Rotor-Gene AssayManager v2.1, consultare il *Manuale utente dell'applicazione core di Rotor-Gene AssayManager v2.1*. Per informazioni sui software aggiuntivi installati nei computer collegati, consultare la Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide (*Guida introduttiva Rotor-Gene AssayManager v2.1*).

Per l'interpretazione automatica dei risultati ottenuti con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e il software Rotor-Gene AssayManager v2.1, è necessario che nel software Rotor-Gene AssayManager v2.1 sia installata la versione più recente del plug-in Gamma. Per accedere alla versione più recente del plug-in, consultare la scheda "Product Resources" della pagina del prodotto Rotor-Gene AssayManager v2.1: www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx.

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR richiede inoltre l'uso di un profilo di dosaggio. Il profilo di dosaggio contiene tutti i parametri necessari per eseguire i cicli e le analisi del dosaggio PITX2. Tali parametri sono bloccati per la durata dell'analisi. Il profilo di dosaggio PITX2 (AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE) corrisponde a un file in formato ".iap" che è possibile scaricare dalla pagina del prodotto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit: www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/therascreen-pitx2-rgq-pcr-kit-ce/ nella scheda "Product Resources", sotto "Protocol Files" (File dei protocolli). Il profilo di dosaggio deve essere importato nel software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Di seguito sono riportati i dettagli riguardo all'installazione del plug-in Gamma e all'importazione del profilo di dosaggio nel software Rotor-Gene AssayManager v2.1.

1. Scaricare il plug-in Gamma da **www.qiagen.com**.
2. Avviare l'installazione facendo doppio clic sul file GammaPlugin.Installation.msi e seguire le istruzioni visualizzate. Per una descrizione dettagliata della procedura di installazione, consultare la sezione "Installazione dei plug-in" nel *Manuale utente dell'applicazione core di Rotor-Gene AssayManager*.
3. Dopo che il plug-in è stato installato correttamente, un utente con privilegi amministrativi per il software Rotor-Gene AssayManager dovrà importare il profilo di dosaggio richiesto come descritto di seguito.
4. Andare a Windows Explorer e salvare il profilo di dosaggio nel seguente file:
"C:\Documents and Settings\All Users\Documents\QIAGEN\
Rotor-GeneAssayManager\Import\AssayProfiles".
5. Aprire il software Rotor-Gene AssayManager facendo clic  sull'icona.
6. Effettuare il login a Rotor-Gene AssayManager con il proprio ID e la propria password. Non modificare la "Closed mode" (Modalità chiusa). Fare clic su "OK". Si apre la schermata di Rotor-Gene AssayManager.
7. Selezionare l'ambiente di configurazione (Figura 15).

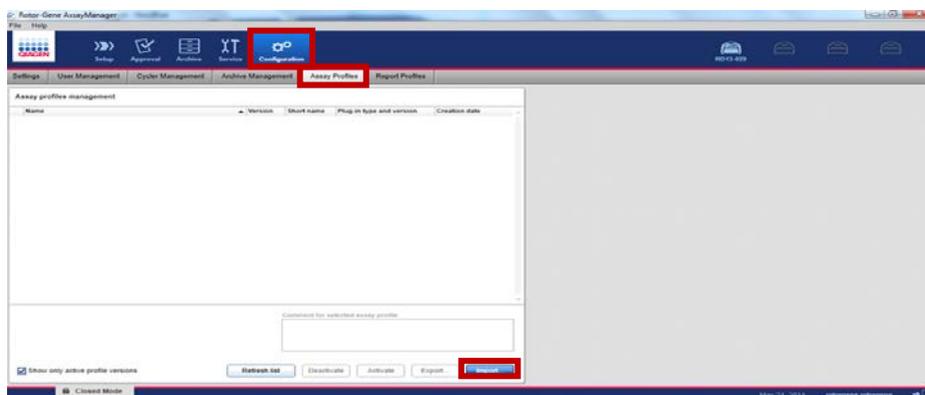


Figura 15. Scheda "Configuration".

-
8. Selezionare la scheda "Assay Profiles" (Profili di dosaggio).
 9. Fare clic su "Import" (Importa).
 10. Nella finestra di dialogo, selezionare il profilo di dosaggio
AP_therascreen_PITX2_FFPE_CE_V1.0.x.iap (dove x = 1 o maggiore) che si desidera importare e fare clic su "Open" (Apri).
 11. Dopo che il profilo di dosaggio è stato importato correttamente, potrà essere utilizzato nell'ambiente "Setup".

Interpretazione dei risultati

Analisi dei dati

L'analisi dei risultati del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR per ogni controllo e ogni campione viene eseguita automaticamente dal software Rotor-Gene AssayManager v2.1 associato con il plug-in Gamma v1.0 e il profilo di dosaggio PITX2 indicato nel seguito come PITX2 Assay Package.

PITX2 Assay Package analizza le curve di amplificazione e potrebbe invalidare quelle che non sono conformi per forma e ampiezza del rumore. In tal caso verrà associato un contrassegno alla curva invalidata. Contrassegni di avviso possono essere visualizzati anche per anomalie non invalidanti delle curve (vedere l'elenco dei contrassegni e i relativi dettagli nella sezione "Contrassegni" alla pagina 62).

Per determinare la validità del dosaggio, PITX2 Assay Package analizza anche i controlli dell'analisi, cioè il riferimento 50 PITX2 RGQ PCR (REF50), il riferimento basso PITX2 RGQ PCR (REFlow), il controllo negativo PITX2 RGQ PCR (NC) e il controllo senza template PITX2 RGQ PCR (NTC). La validità dei singoli controlli è basata sulla conformità ai valori di C_T e/o di PMR con le specifiche predefinite (vedere "Risultati complessivi del campione" a pagina 60 e "Contrassegni" a pagina 62).

Nota: se almeno un controllo è non valido, i risultati ottenuti per tutti i campioni di test sono considerati non validi e non viene visualizzato alcun risultato di PMR.

PITX2 Assay Package inoltre analizza i campioni verificando la validità dei duplicati e la validità della quantità iniziale (vedere "Risultati complessivi del campione" a pagina 60 e "Contrassegni" a pagina 62). Infine, un valore di PMR senza cifre decimali viene assegnato ai campioni mediando i due risultati di PMR ottenuti per i due replicati del campione. Il valore di PMR ottenuto per ogni campione di un paziente fornirà informazioni ai medici curanti

riguardo alla probabilità di risposta del paziente alla chemioterapia basata su antraciclina. Se il valore di PMR ottenuto è pari o inferiore a 12, è probabile che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina. Se viceversa il valore di PMR ottenuto è superiore a 12, si potrebbe proporre un trattamento alternativo, in quanto la probabilità che il paziente risponda alla chemioterapia basata su antraciclina è minore (Figura 16).

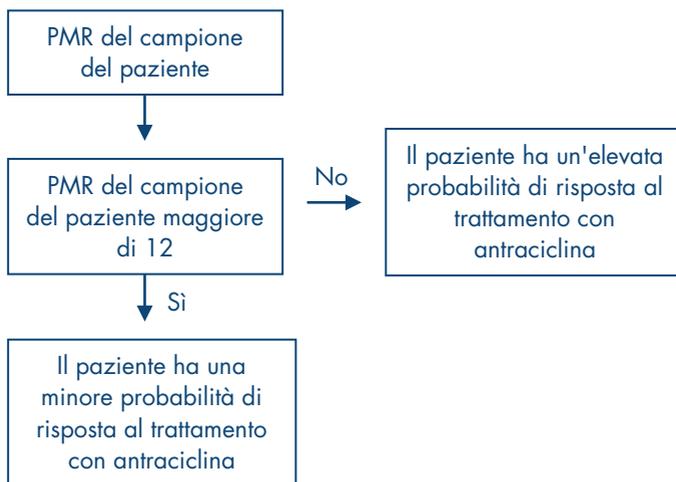


Figura 16. Interpretazione dei risultati di PMR di campioni dei pazienti per il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

I risultati dei campioni di analisi, analizzati e impostati automaticamente da PITX2 Assay Package, devono essere convalidati e rilasciati da un utente con il ruolo di “Approver”. In fondo alla riga specifica dei risultati dei campioni da approvare sono presenti tre pulsanti di convalida. Questi pulsanti consentono di convalidare o rifiutare i risultati dei campioni in modo interattivo. Per maggiori informazioni, fare riferimento al *Manuale utente del plug-in Gamma di Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Nota sul controllo del flusso di lavoro: il campione HD216 (controllo del flusso di lavoro) dovrebbe dare un valore di PMR compreso tra 30 e 50. Se il valore di PMR viene ottenuto con questo controllo del flusso di lavoro, è possibile validare sia la fase di purificazione del gDNA che quella della conversione mediante bisolfito.

In caso di risultati non validi, fare riferimento a “Guida alla risoluzione dei problemi”, pagina 68.

Ripetizioni del test

In caso di risultati non validi, è necessario ripetere i test. Se il dosaggio è non valido, se cioè uno dei quattro controlli è non valido, occorre ripetere l'intera analisi, includendo tutti i campioni testati. Se il dosaggio è valido ma uno o più campioni sono non validi, occorre ripetere i test per i campioni non validi dopo aver indagato di che tipo di errore si è trattato (vedere “Contrassegni” a pagina 62 Tabella 6 e Tabella 7 a pagina 63–64). La Figura 17 illustra un flusso di lavoro per la procedura di ripetizione dei test.

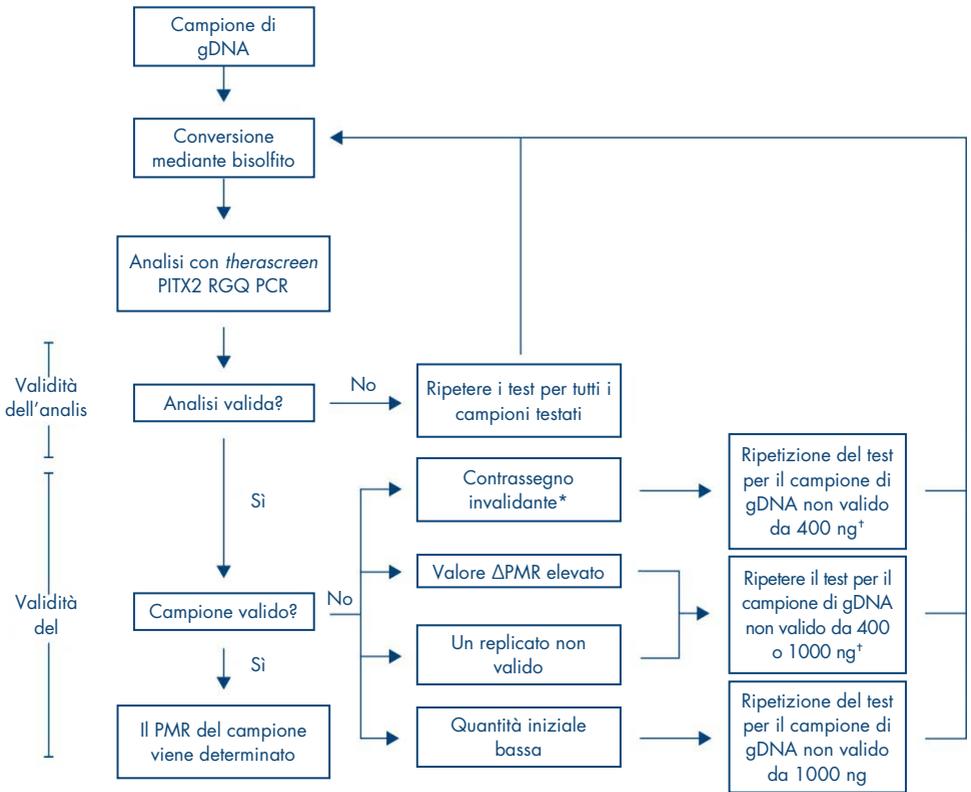


Figura 17. Flusso di lavoro per la ripetizione dei test con il kit *theascreen* PITX2 RGQ PCR.

* Vedere Tabella 6 e Tabella 7, pagina 63–64.

† Se non è disponibile una quantità di gDNA sufficiente è possibile utilizzare una quantità iniziale di 200 ng, tuttavia in tal caso il rischio di risultato non valido a causa del contrassegno “low input” (quantità iniziale bassa) è maggiore.

Visualizzazione dei risultati

Target e target combinati

I risultati per ogni reazione del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR vengono visualizzati sotto ai seguenti nomi di target e target combinati.

- "FAM_Methylated_1" (FAM_metilato_1): risultati del canale verde per tutti i controlli e per il replicato 1 dei campioni di analisi.
- "FAM_Methylated_2" (FAM_metilato_2): risultati del canale verde per il replicato 2 dei campioni di analisi.
- "HEX_Unmethylated_1" (HEX_non-metilato_1): risultati del canale giallo per tutti i controlli e per il replicato 1 dei campioni di analisi.
- "HEX_Unmethylated_2" (HEX_non-metilato_2): risultati del canale giallo per il replicato 2 dei campioni di analisi.
- "PMR": questi target sono target combinati; i risultati corrispondenti tengono conto della validità dei controlli. Se validi, questi target vengono mostrati per tutti i controlli e i campioni di analisi.
- "Mean_PMR" (PMR medio): questi target sono target combinati; i risultati corrispondenti tengono conto della validità dei controlli. Questi target vengono mostrati per tutti i campioni di analisi validi.

Risultati complessivi del campione

La conclusione dell'analisi per ogni controllo e ogni campione viene visualizzata nella colonna "Overall Sample Result" (Risultato complessivo del campione) del report (Tabella 4).

Tabella 4. Risultati complessivo del campione e azioni

Risultato complessivo del campione	Tipo di campione	Descrizione	Azione
Valido	REF50, REFlow, NC, NTC e campione di analisi*	Controllo o campione di analisi valido	N/A
Non valido†	REF50, REFlow, NC, NTC e campione di analisi	Controllo non valido	Ripetere l'intera analisi
Non valido	Campione di analisi	Campione di analisi non valido	Impostare una nuova analisi per ripetere il test sui campioni non validi
Non valido, un replicato non valido	Campione di analisi	Se uno dei target (FAM_Methylated_1, FAM_Methylated_2, HEX_Unmethylated_1 o HEX_Unmethylated_2) è non valido, il campione è considerato non valido.	Impostare una nuova analisi per ripetere il test sui campioni non validi
Non valido, valore delta PMR elevato‡	Campione di analisi	Se il valore del delta PMR tra il primo e il secondo replicato è maggiore di un valore specifico§, il campione è considerato non valido.	Impostare una nuova analisi per ripetere il test sui campioni non validi

* L'interpretazione dei risultati di PMR validi del campione di analisi è stata illustrata precedentemente (vedere la Figura 16).

† Quando i controlli sono non validi, i valori di C_T non validi e i risultati di PMR vengono visualizzati entro parentesi quadre a titolo informativo.

‡ Quando un campione risulta invalidato a causa di un elevato valore del delta PMR, i valori di C_T , i risultati di PMR di entrambi i replicati e il valore di PMR medio vengono visualizzati a titolo informativo. Occorre tuttavia ripetere il test sul campione per ottenere un risultato valido.

§ Il valore specifico varia a seconda del valore di PMR ottenuto per ogni campione (vedere la Tabella 5 alla pagina seguente).

Tabella 5. Criteri relativi a delta PMR

PMR medio	Delta PMR tra i duplicati
0-1	≤ 1
1-5	≤ 5
5-10	≤ 7
10-15	≤ 9
15-35	≤ 13
35-65	≤ 15
65-85	≤ 18
85-100	≤ 6

Contrassegni

I contrassegni (flag) vengono visualizzati per fornire informazioni aggiuntive sui risultati ottenuti, in particolare per i risultati non validi. Le anomalie non problematiche possono essere segnalate da un semplice avviso che non rimanda a un risultato non valido. Per conoscere i contrassegni universali inclusi nel plug-in Gamma, vedere anche il *Manuale utente del plug-in Gamma di Rotor-Gene AssayManager*.

L'analisi automatica del dosaggio con kit *therascreen PITX2 RGQ PCR* può generare sia contrassegni specifici del dosaggio (Tabella 6, pagina seguente) che contrassegni di tipo generale (Tabella 7, pagina 64).

Tabella 6. Contrassegni specifici del dosaggio

Contrassegno specifico del dosaggio	Tipo di campione	Descrizione	Azione
Contrassegni specifici del dosaggio per i controlli			
BELOW_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFflow	Il risultato di PMR è inferiore all'intervallo di accettazione (<36 per REF50, <2 per REFflow).	Ripetere l'intera analisi
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	REF50, REFflow	Il risultato di PMR è superiore all'intervallo di accettazione (>65 per REF50, >13 perREFflow).	Ripetere l'intera analisi
NO_SIGNAL	REF50	Il valore di C _T del target FAM_Methylated_1 e/o del target HEX_Unmethylated_1 è >32	Ripetere l'intera analisi
NO_SIGNAL	REFlow	Il valore di C _T del target HEX_Unmethylated_1 è >32	Ripetere l'intera analisi
Contrassegni specifici del dosaggio per i campioni di analisi			
PMR_ABOVE_OR_EQUAL_92*	Campione di analisi	Il risultato di PMR è superiore al limite di rivelazione determinato per la sonda avente come target sequenze precedentemente non metilate. Questo contrassegno non invalida il risultato, costituisce solo un'avvertenza.	Nessuna
PMR_BELOW_OR_EQUAL_4*	Campione di analisi	Il risultato di PMR è inferiore al limite di rivelazione determinato per la sonda avente come target sequenze precedentemente metilate. Questo contrassegno non invalida il risultato, costituisce solo un'avvertenza.	Nessuna
LOW_INPUT_RETEST_NEEDED	Campione di analisi	I valori di C _T dei target FAM_Methylated_1 e HEX_Unmethylated_1 oppure FAM_Methylated_2 e HEX_Unmethylated_2 sono >32,5	Aumentare la quantità iniziale di gDNA nella conversione mediante bisolfito e ripetere l'analisi.

* Poiché i risultati di PMR vengono forniti senza cifre decimali ma il software calcola i valori di PMR con le cifre decimali, il contrassegno relativo al limite di rivelazione può essere o non essere presente in corrispondenza dei limiti estremi di PMR, cioè 4 e 92. I contrassegni sono presenti infatti per risultati di PMR >92 e <4, per cui per esempio risultati di PMR di 4,1 o 91,8, che vengono arrotondati rispettivamente a 4 e a 92, non vengono contrassegnati rispettivamente come valore inferiore e valore inferiore rispetto al limite di rivelazione.

Nota: Tutti i contrassegni sopra riportati sono invalidanti a eccezione dei due relativi al limite di rivelazione. Quando si ha un replicato non valido, i valori di C_T vengono visualizzati entro parentesi quadre a titolo informativo ma il risultato di PMR non valido non viene visualizzato. Anche il valore di PMR medio tra i due replicati non viene visualizzato.

Tabella 7. Contrassegni generali

Contrassegno generale	Comportamento	Descrizione	Azione
CONSECUTIVE_FAULT	Non valido	Un target utilizzato per il calcolo del target non è valido.	Se il problema è dovuto alla non validità di un controllo, ripetere il test del campione o l'intera analisi.
ASSAY_INVALID	Non valido	Il dosaggio non è valido perché almeno un controllo è non valido.	Ripetere l'intera analisi.
ANALYSIS_FAILED	Non valido	Il saggio non è valido perché l'analisi non è riuscita per varie ragioni.	Contattare il supporto tecnico QIAGEN.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Non valido	La curva di amplificazione dei dati grezzi ha una forma che si discosta dal comportamento previsto per questo dosaggio. Vi è un'elevata probabilità di risultati non corretti o interpretati erroneamente.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
FLAT_BUMP	Non valido	La curva di amplificazione dei dati grezzi ha una forma a pancia piatta che si discosta dal comportamento previsto per questo dosaggio. Vi è un'elevata probabilità di risultati non corretti o interpretati erroneamente (ad esempio, errata determinazione del valore di C_T).	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
INVALID_CALCULATION	Non valido	Il calcolo per questo target non è riuscito.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Avvertenza	La percentuale della variazione di fluorescenza per questo campione rispetto a quella della provetta di campione con la maggiore variazione di fluorescenza è inferiore a un limite definito.	Nessuna
LOW_REACTION_EFFICIENCY	Avvertenza	L'efficienza di reazione per questo campione non ha raggiunto un limite definito.	Nessuna
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Non valido	La curva di amplificazione attraversa la soglia più di una volta. Non è possibile determinare un valore C_T non ambiguo.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.

NO_BASELINE	Non valido	Non è stata trovata alcuna linea di base iniziale. Non è possibile eseguire l'analisi successiva.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
RUN_FAILED	Non valido	Il test non è valido a causa di un problema riguardante il ciclatore o la connessione del ciclatore.	Ripetere l'intera analisi.
RUN_STOPPED	Non valido	Il test non è valido perché l'analisi è stata interrotta manualmente.	Ripetere l'intera analisi.
SATURATION	Non valido	La fluorescenza dei dati grezzi è fortemente saturante prima del punto di flesso della curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
SATURATION_IN_PLATEAU	Avvertenza	La fluorescenza dei dati non elaborati risulta satura nella fase di plateau della curva di amplificazione.	Nessuna
SPIKE	Avvertenza	È stato rilevato un picco nella fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione, ma esternamente alla regione in cui viene determinato il valore di C_T .	Nessuna
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Non valido	È stato rilevato un picco nella curva di amplificazione vicino al valore di C_T .	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
STEEP_BASELINE	Non valido	È stata rilevata una forte impennata della linea di base per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
STRONG_BASELINE_DIP	Non valido	È stato rilevato un forte crollo della linea di base per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
STRONG_NOISE	Non valido	È stato rilevato un forte rumore esternamente alla fase di crescita della curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.

STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Non valido	È stato rilevato un forte rumore nella fase di crescita (esponenziale) della curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Non valido	È stata rilevata una linea di base ondulata per la fluorescenza dei dati grezzi nella curva di amplificazione.	Se il problema viene osservato in un controllo, ripetere il test del campione o l'analisi.

Nota: Quando si ha un replicato che presenta un contrassegno invalidante, i valori di CT vengono visualizzati entro parentesi quadre a titolo informativo ma il risultato di PMR non valido non viene visualizzato. Anche il valore di PMR medio tra i due replicati non viene visualizzato.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali problemi che potrebbero presentarsi nella determinazione del PMR del promotore 2 di PITX2 mediante il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti visitare il sito www.qiagen.com).

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi riguardanti la soluzione di deparaffinazione (n. cat. 19093), il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n. cat. 60404) e il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n. cat. 59824 o 59826), consultare i manuali dei kit corrispondenti.

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi riguardanti lo strumento Rotor-Gene Q MDx e il software Rotor-Gene AssayManager v2.1, consultare i rispettivi manuali d'uso.

Commenti e suggerimenti

Bassa resa di gDNA

La quantità di gDNA purificato è inferiore ai 400 ng raccomandati per eseguire il flusso di lavoro con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR.

È possibile utilizzare una quantità iniziale di 200 ng, tuttavia in tal caso il rischio di risultato non valido a causa del contrassegno "low input" (quantità iniziale bassa) è maggiore.

Dosaggio non valido perché REFlow e/o REF50 non validi

- | | |
|---|---|
| a) Un componente della miscela di reazione non è stato aggiunto | Verificare che la miscela di reazione sia stata preparata correttamente (Tabella 3, pagina 39). Verificare che siano stati aggiunti tutti i componenti della miscela di reazione della qPCR. Ripetere la PCR. |
| b) Errore dello strumento Rotor-Gene Q MDx | Controllare i registri di manutenzione dello strumento.
Ad esempio, un allineamento impreciso della lente può causare un fondo più elevato. Se l'allineamento della lente non rientra nel programma di manutenzione, contattare il supporto tecnico QIAGEN per richiedere maggiori informazioni e un possibile intervento. |

Commenti e suggerimenti

c) Errore degli accessori dello strumento Rotor-Gene Q MDx	Il rotore a 72 pozzetti potrebbe non essere stato chiuso correttamente. Ripetere la PCR.
d) La miscela di reazione si è degradata	Il kit è stato congelato/scongelato più di quattro volte oppure il contenuto del kit non è stato conservato tra -30°C e -15°C oppure ancora la miscela PPM o la miscela di reazione non sono stati mantenuti al riparo dalla luce. Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta) dei reagenti e utilizzare un nuovo kit. Ripetere la PCR.
e) Scambio di strisce di provette e/o ID del campione	Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Ripetere la PCR.
f) Controlli mancanti o caricati in posizione non corretta	Assicurarsi che i controlli siano stati caricati nella posizione corretta.
g) Miscelazione dei campioni di controllo insufficiente	Lo scongelamento dei controlli prima del caricamento era insufficiente oppure la miscelazione dei controlli con la miscela di reazione (pipettatura su e giù) non è stata effettuata correttamente. Ripetere la PCR.
h) Volume di pipettatura non corretto	Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Verificare che siano stati aggiunti un volume pari a 4 µl di controllo e un volume pari a 16 µl di miscela di reazione di qPCR. Ispezionare visivamente i volumi pipettati. Verificare le pipette e, se necessario, ricalibrarle prima di ripetere la fase di qPCR.
i) Chiusura imperfetta della provetta	La chiusura imperfetta della provetta ha provocato l'evaporazione durante la qPCR.

Dosaggio non valido perché controllo senza template (NTC) o controllo negativo (NC) non validi

a) Contaminazione crociata o contaminazione dei reagenti	Manipolare sempre i campioni, i componenti dei kit e i materiali di consumo rispettando le pratiche consigliate per prevenire la contaminazione da carryover. Assicurarsi che i puntali siano sostituiti ogni volta che vengono pipettati reagenti differenti o quando vengono caricate provette differenti. Preparare la miscela di reazione di qPCR con materiale (pipette, puntali e così via) dedicato. Preparare la miscela di reazione di qPCR e la reazione NTC in un'area dedicata, dove non vengano introdotte matrici di DNA (DNA, plasmidi o prodotti della PCR). Ripetere la PCR.
--	--

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|--|
| b) Un componente della miscela di reazione non è stato aggiunto | Verificare che la miscela di reazione sia stata preparata correttamente (Tabella 3, pagina 39). Verificare che siano stati aggiunti tutti i componenti della miscela di reazione della qPCR. Ripetere la PCR. |
| c) Scambio di strisce di provette e/o ID del campione | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Ripetere la seduta di qPCR. |
| d) La miscela di reazione o le sonde si sono degradate | Conservare il contenuto del kit tra -30°C e -15°C e proteggere la provetta della miscela PPM dalla luce.
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta) dei reagenti e utilizzare un nuovo kit. Ripetere la PCR. |
| e) Curva di amplificazione non corretta (artefatti) | Verificare se nell'amplificazione corrispondente sono presenti curve inusuali (ad es., una linea retta).
Ripetere la seduta di qPCR. |

Campione non valido a seguito di contrassegno "Low input"

- | | |
|--|---|
| a) Condizioni del blocchetto FFPE | Verificare le condizioni di trasporto/conservazione del blocchetto FFPE utilizzato. |
| b) Preparazione del blocchetto FFPE | Assicurarsi che il campione sia stato fissato in formalina al 4-10%. Verificare che siano state tagliate una o due sezioni dello spessore di 5 µm per raggiungere una superficie di tessuto di 100 mm ² in modo da garantire una quantità di cellule sufficiente. |
| c) Il volume di pipettatura potrebbe non essere corretto | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Verificare che siano stati aggiunti un volume pari a 4 µl di campione e un volume pari a 16 µl di miscela di reazione di qPCR. Ispezionare visivamente i volumi pipettati.
Verificare le pipette e, se necessario, ricalibrarle prima di ripetere la fase di qPCR. |
| d) La purificazione o la conversione mediante bisolfito del gDNA non sono riuscite | Verificare se il controllo del flusso di lavoro ha dato i risultati attesi. Assicurarsi che il protocollo per il flusso di lavoro del kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR sia stato seguito come descritto in precedenza. Assicurarsi che i kit non siano scaduti, che i reagenti siano stati preparati correttamente (ad es. che l'etanolo sia stato aggiunto e che si sia evitato di trasferire precipitato nella colonna spin per DNA MinElute). Verificare che la temperatura ambientale non sia inferiore a 15°C durante la manipolazione per evitare la cristallizzazione dei tamponi. Verificare le condizioni di trasporto e conservazione.
Ripetere l'intero flusso di lavoro. |
| e) Scambio di strisce di provette e/o ID del campione | Verificare lo schema di pipettatura e il corretto posizionamento delle provette vuote e controllare la configurazione della reazione. Ripetere la PCR. |

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|--|
| f) Cattiva qualità del campione di gDNA | Ripetere con più materiale. È possibile utilizzare una quantità iniziale fino a 1000 ng di DNA misurati con un metodo OD 260 nm. |
| g) Chiusura imperfetta della provetta | La chiusura imperfetta della provetta ha provocato l'evaporazione durante la qPCR. |
| h) Campione non caricato | Assicurarsi che il campione sia stato caricato in entrambi i pozzetti. |

Campione non valido a seguito di delta PMR elevato

- | | |
|--|---|
| a) La miscela di reazione si è degradata | Conservare il contenuto del kit tra -30°C e -15°C e proteggere le miscele di reazione dalla luce.
Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta) dei reagenti e utilizzare un nuovo kit. Ripetere la PCR. |
| b) Il volume di pipettatura potrebbe non essere corretto | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.
Verificare che siano stati aggiunti un volume pari a 4 µl di controllo/campione e un volume pari a 16 µl di miscela di reazione di qPCR.
Ispezionare visivamente i volumi pipettati.
Verificare le pipette e, se necessario, ricalibrarle prima di ripetere la fase di qPCR. |
| c) Scambio di strisce di provette e/o ID del campione | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione.
Ripetere la PCR. |
| d) La curva di amplificazione potrebbe non essere corretta | Verificare se nel grafico di amplificazione corrispondente sono presenti curve inusuali.
Ripetere il test del campione non valido. |
| e) Ritardo del segnale dovuto al fatto che la bassa quantità determina una maggiore variabilità dei risultati di PMR | Ripetere con più materiale. È possibile utilizzare una quantità iniziale fino a 1000 ng di DNA misurati con un metodo OD 260 nm. |
| f) Miscelazione dei campioni di controllo insufficiente | Lo scongelamento del controllo prima del caricamento era insufficiente oppure la miscelazione del controllo con la miscela di reazione (pipettatura su e giù) non è stata effettuata correttamente. Ripetere la PCR. |
| g) Chiusura imperfetta della provetta | La chiusura imperfetta della provetta ha provocato l'evaporazione durante la qPCR. |

Campione non valido poiché un replicato è non valido

- | | |
|---|--|
| a) Materiale insufficiente (vicino al limite) | Ripetere con più materiale. È possibile utilizzare una quantità iniziale fino a 1000 ng di DNA misurati con un metodo OD 260 nm. |
|---|--|

Commenti e suggerimenti

- | | |
|--|---|
| b) Il volume di pipettatura potrebbe non essere corretto | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Verificare che siano stati aggiunti un volume pari a 4 µl di controllo/campione e un volume pari a 16 µl di miscela di reazione di qPCR. Ispezionare visivamente i volumi pipettati.

Verificare le pipette e, se necessario, ricalibrarle prima di ripetere la fase di qPCR. |
| c) Scambio di strisce di provette e/o ID del campione | Verificare lo schema di pipettatura e la configurazione della reazione. Ripetere la PCR. |
| d) La curva di amplificazione potrebbe non essere corretta | Verificare se nel grafico di amplificazione corrispondente sono presenti curve inusuali.

Ripetere la PCR. |
| e) Miscelazione dei campioni di controllo insufficiente | Lo scongelamento del controllo prima del caricamento era insufficiente oppure la miscelazione del controllo con la miscela di reazione (pipettatura su e giù) non è stata effettuata correttamente. Ripetere la PCR. |
| f) Chiusura imperfetta della provetta | La chiusura imperfetta della provetta ha provocato l'evaporazione durante la qPCR. |
| g) Uno dei due pozzetti del campione non è stato caricato | Assicurarsi che il campione sia stato caricato in entrambi i pozzetti. |

Errore dell'analisi a causa del segnale di fluorescenza incoerente nei controlli e/o nei campioni (per tutte le provette)

- | | |
|---|---|
| Errore degli accessori dello strumento Rotor-Gene Q MDx | Controllare i registri di manutenzione dello strumento.
Il rotore con 72 pozzetti potrebbe essere difettoso. |
|---|---|

Controllo qualità

In conformità con il Sistema di gestione della qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR viene testato rispetto a specifiche prestabilite per garantire la costante qualità del prodotto.

Il controllo qualità del kit completo è stato eseguito su uno strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Questo kit è prodotto in conformità allo standard ISO 13485. I certificati di analisi sono disponibili su richiesta sul sito www.qiagen.com/support/.

Limitazioni

Il kit è destinato all'uso professionale. Le prestazioni del sistema sono state determinate utilizzando soltanto tessuti di tumore della mammella fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è stato validato soltanto per il tessuto FFPE ottenuto da pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con recettori degli estrogeni positivi, HER2 negativi e linfonodi positivi.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso da parte di personale qualificato, quali tecnici di laboratorio e medici, con formazione relativa alle tecniche di biologia molecolare e alle procedure di diagnostica in vitro.

Il kit deve essere utilizzato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale, in combinazione con uno degli strumenti approvati elencati nella sezione "Materiale necessario ma non fornito" a pagina 12).

Tutti i reagenti forniti con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit.

Prestare attenzione alle date di scadenza stampate sull'etichetta della confezione. Non utilizzare componenti scaduti.

Il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è validato soltanto per uso con la soluzione di deparaffinazione (n. cat. 19093), lo xilene-etanolo o l'histolemon-etanolo, con il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (n. cat. 60404) e con il kit EpiTect Fast DNA Bisulfite (n. cat. 59824 o 59826).

Soltanto lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (per PCR) è stato validato.

Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o alterazione dei componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

Tutti i risultati diagnostici devono essere prodotti in combinazione con altri esiti clinici o di laboratorio.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Caratteristiche prestazionali

In tutti gli studi di questa sezione, quando si sono utilizzati campioni biologici, la fase di deparaffinazione che precede l'estrazione del gDNA è stata effettuata utilizzando la soluzione di deparaffinazione QIAGEN. Si osservi tuttavia che l'equivalenza tra la soluzione di deparaffinazione e lo xilene o l'histolemon è stata dimostrata.

Limite del bianco

Il limite del bianco (LoB) è stato determinato sulla base dei punti dati corrispondenti al 95esimo percentile inferiore e superiore dei risultati ottenuti rispettivamente con campioni di tipo PMR 0 e PMR 100, come descritto in CLSI/NCCLS EP17-A2 (14). I campioni testati corrispondono a campioni artificiali generati con numeri di copie differenti (100, 200, 500 e 750 copie) di plasmidi non target (target dell'altra sonda) in un fondo di gDNA non convertito. I risultati di LoB si basano su 64 e 63 misurazioni per lotto per le sonde aventi come target sequenze precedentemente metilate e su 64 e 61 misurazioni per lotto per le sonde aventi come target sequenze precedentemente non metilate, utilizzando due differenti lotti pilota del kit. I risultati di LoB sono riassunti nella Tabella 8.

Tabella 8. Riassunto dei risultati relativi al limite del bianco

	Campioni PMR 0		Campioni PMR 100	
	LoB misurato, PMR	LoB finale, PMR	LoB misurato, PMR	LoB finale, PMR
Lotto 1	0		99	
Lotto 2	0	0	98	98

Limite di rilevazione

Secondo l'approccio Probit descritto in CLSI/NCCLS EP17-A2 (14), il limite di rilevazione (LoD) è il valore di PMR per il quale il 95% delle misurazioni supera il LoB. Il LoD è stato determinato per ogni sonda con una quantità iniziale di gDNA minima di 200 ng e con la quantità iniziale di gDNA raccomandata di 400 ng, utilizzando due lotti pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR differenti. Si sono utilizzati tre campioni per quantità iniziale testata (200 ng e 400 ng) e per sonda. Questi campioni sono stati prodotti per differenti numeri di copie amplificabili totali, cioè 50, 100 e 150 copie per la quantità iniziale di gDNA di 200 ng e 100, 200 e 300 copie per la quantità iniziale di gDNA di 400 ng. Pertanto, 60 campioni sono stati prodotti in totale per lo studio del LoD. I campioni testati corrispondono a campioni artificiali prodotti a partire da miscele di plasmidi target e non target (dando cinque livelli di PMR teorici differenti per campione) in un fondo di gDNA non convertito. Per ogni sonda testata e per ogni quantità iniziale, i risultati di LoD sono stati ottenuti a partire da almeno 20 misurazioni per ogni lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e per ogni livello di PMR di ogni campione. Il LoD è 4 per i campioni a basso PMR e 92 per i campioni a PMR elevato (Tabella 9).

Tabella 9. Riassunto dei risultati relativi al limite di rilevazione

Campione	Quantità iniziale (ng)	Lotto	Valore del LOD	Valore inferiore	Valore superiore
Campione a basso PMR	200	Lotto 1	3	3	5
	200	Lotto 2	3	3	4
	400	Lotto 1	3	2	6
	400	Lotto 2	4	3	6
Campione a PMR elevato	200	Lotto 1	92	92	92
	200	Lotto 2	>92	N/A	N/A
	400	Lotto 1	94	93	95
	400	Lotto 2	95	93	95

N/A: Non applicabile.

Volume iniziale di DNA

Sono stati testate cinque differenti quantità iniziali di gDNA (50, 100, 200, 400 e 1000 ng), ognuna con setti livelli di PMR differenti (0, 5, 10, 25, 40, 50 e 75). La quantità iniziale massima di gDNA è stata definita pari a 1000 ng per motivi tecnici, poiché una quantità superiore sarebbe difficile da ottenere in una situazione reale. L'intervallo di quantità iniziale di gDNA accettabile per il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è stato determinato mediante regressione di Deming utilizzando un lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e uno strumento Rotor-Gene Q MDx.

Lo studio ha dimostrato quanto segue.

- La quantità iniziale di gDNA raccomandata per l'utilizzo con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è di 400 ng.
- La quantità iniziale minima di gDNA accettabile è di 200 ng e la quantità iniziale massima di gDNA è di 1000 ng.
- La quantità iniziale minima di gDNA deve sottoposta al test soltanto se non è possibile ottenere la quantità iniziale raccomandata, poiché in tal caso il rischio di ottenere un risultato non valido a causa della bassa quantità iniziale è maggiore e di conseguenza la probabilità che sia necessario ripetere il test è elevata. Si raccomanda di utilizzare la quantità iniziale massima di gDNA quando la quantità iniziale di gDNA di 400 ng fornisce un risultato di PMR non valido a causa, per esempio, di un contrassegno di quantità iniziale bassa.

Linearità

Lo studio di linearità è stato condotto in conformità con CLSI/NCCLS EP6-A (15). La linearità del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR è stata determinata su sette campioni con differenti livelli di PMR (0, 5, 10, 25, 40, 50 e 75) preparati a partire da cinque quantità iniziali di gDNA differenti (inclusi 200, 400 e 1000 ng). Lo studio è stato effettuato da un operatore utilizzando un lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR con uno strumento Rotor-Gene Q MDx. Lo studio ha confermato la linearità con campioni per i quali il PMR è compreso tra 5 e 50 alle quantità iniziali di gDNA accettabili (cioè tra 200 e 1000 ng).

Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità e la riproducibilità del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR sono state determinate nel corso di uno studio di precisione in un unico sito e di uno studio di precisione su più siti, entrambi condotti in conformità con CLSI/NCCLS EP5-A3 (16) (vedere la Tabella 10 e la Tabella 11). Gli studi di precisione sono stati effettuati su tre campioni biologici con un livello di PMR molto basso, basso ed elevato (rispettivamente 9, 16 e 77). Nello studio di precisione condotto in un unico sito, le fonti di variabilità sono state valutate da tre operatori su 23 giornate lavorative non consecutive utilizzando tre lotti pilota differenti del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e tre strumenti Rotor-Gene Q MDx. Due misurazioni per campione sono state effettuate in ogni analisi. Due analisi identiche sono state effettuate al giorno con un intervallo di almeno due ore tra loro. La durata dell'analisi è variata nel corso della giornata lavorativa, mantenendo un intervallo di almeno due ore tra le analisi per introdurre una maggiore casualità nel test. Lo studio di precisione su più siti è stato condotto da un unico operatore in tre siti differenti utilizzando un unico lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR Kit con un unico strumento Rotor-Gene Q MDx. Cinque misurazioni per campione sono state effettuate in ogni analisi. Un'analisi al giorno è stata effettuata in ogni sito, alternando tra mattina e pomeriggio.

Tabella 10. Riassunto dei risultati dello studio di precisione in un unico sito

Campione	Fonte di variabilità (%)						
	Intra analisi	Analisi	Lotto	Strumento	Operatore	Giorno	Totale
PMR molto basso	12,29	4,20	0,00	12,54	0,00	9,49	20,39
PMR basso	19,99	0,00	0,00	3,09	0,00	8,04	21,76
PMR elevato	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	1,64	4,23

Tabella 11. Riassunto dei risultati dello studio di precisione su più siti

Campione	Fonte di variabilità (%)			
	Inter analisi	Giorno	Sito	Totale
PMR molto basso	13,90	8,43	4,72	16,93
PMR basso	28,72	0,00	0,00	28,72
PMR elevato	4,25	0,00	1,77	4,61

Sostanze interferenti

Lo studio delle sostanze interferenti è stato condotto in conformità con CLSI/NCCLS EP7-A2 (17). La concentrazione finale di ogni sostanza utilizzata nel flusso di lavoro di preparazione del campione è stata preventivamente valutata (tenendo conto degli effetti della diluizione in ogni fase). Sulla base della rilevanza della concentrazione finale di ogni sostanza nel materiale di partenza per il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (cioè il bisDNA), tutte le potenziali sostanze interferenti sono state testate con un lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR. I risultati non hanno evidenziato alcun effetto di interferenza da parte delle sostanze utilizzate nel flusso di lavoro del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR (Tabella 12).

Tabella 12. Sostanze interferenti testate

Sostanze testate	Volume finale testato in 30 μ l
Soluzione di deparaffinazione	$1,4 \times 10^{-15}$
Histolemon	$2,10 \times 10^{20}$
Etanolo (96-100%)	0,50
Soluzione di bisolfito	$7,2 \times 10^{-09}$
Tampone DNA Protect	$2,26 \times 10^{-10}$
Tampone BL	$3,44 \times 10^{08}$
Tampone BW	0,1102
Tampone BD	0,002

Contaminazione crociata

La contaminazione crociata tra campioni negativi e positivi è stata valutata utilizzando un lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e due strumenti Rotor-Gene Q MDx. Sei condizioni sono state testate utilizzando il controllo NTC e/o il controllo negativo come campioni negativi con o senza un campione di bisDNA, dando un basso valore di PMR come campione positivo. Il livello di contaminazione crociata è stato valutato pari all'1,3%.

Finestra temporale di utilizzo

La finestra temporale massima tra la preparazione della piastra e l'avvio della qPCR è stata determinata utilizzando un lotto pilota del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR e campioni artificiali generati da plasmidi target e non target con un livello medio di PMR. La finestra temporale massima accettabile è di 24 ore, tuttavia si raccomanda di avviare la seduta di qPCR con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR il prima possibile dopo la preparazione della piastra (cioè dopo aver caricato i campioni da testare).

Validazione del cut-off clinico

Un'analisi prospettica è stata effettuata per validare il cut-off clinico del kit *therascreen PITX2 RGQ PCR* con tessuti FFPE ottenuti da 145 pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con linfonodi positivi, recettori degli estrogeni positivi e HER2 negativi. I campioni inclusi nello studio erano tessuti FFPE conservati rispondenti ai seguenti criteri:

- tumore invasivo della mammella istologicamente confermato;
- tumore primario allo stadio pT1, pT2 e pT3;
- interessamento dei linfonodi istologicamente confermato ($\geq N1$);
- chemioterapia adiuvante standard basata su antraciclina;
- non sottoposti a terapia dose-dense;
- non sottoposti ad altra chemioterapia sistemica primaria (non sottoposto a tassani) a eccezione della terapia ormonale.

Il valore di PMR è stato misurato per ogni campione utilizzando il formato finale del kit e le istruzioni riportate nel manuale.

L'endpoint primario era la sopravvivenza senza malattia (disease-free survival, DFS), definita come il tempo trascorso tra l'intervento chirurgico primario e il primo evento DFS documentato. La data dell'intervento chirurgico primario è stata considerata la data di riferimento del follow-up. Gli eventi DFS includevano ricorrenza del tumore (ricorrenza locale della malattia o metastasi distali), forme maligne secondarie considerate potenzialmente letali e decesso per qualsiasi causa. Per i pazienti deceduti senza ricorrenza del tumore è stata applicata un'analisi dei rischi concorrenti secondo Fine e Gray (13).

L'analisi è stata effettuata con un troncamento del tempo di follow-up di DFS a 10°anni. Le curve di sopravvivenza sono state calcolate secondo la funzione di incidenza (13). Il valore di cut-off predefinito di PITX2 pari a PMR 12 ha dimostrato una differenziazione statisticamente significativa tra i due gruppi per l'endpoint primario DFS con un livello di significatività $p < 0,05$ (bilaterale; valore alfa). Pertanto, lo stato di metilazione del promotore di PITX2 valutato con il kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR ha mostrato un valore predittivo per la chemioterapia basata su antraciclina in pazienti ad alto rischio affetti da tumore della mammella con linfonodi positivi, recettori degli estrogeni positivi e HER2 negativi.

Bibliografia

1. Basu, M., Roy, S.S. (2013) Wnt/ β -Catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *J Biol Chem.* **288**, 4355.
2. Chen, F., Chen F., Yao, H., et al. (2016) Suppressing Pitx2 inhibits proliferation and promotes differentiation of iHepSCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **80**, 154.
3. Fung, F.K., Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, T.H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. (2012) Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression. *PLoS One* **7**, e37076.
4. Lee, W-L., Chakraborty, P.K., Thévenod, F. (2013) Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1. *Int. J. Cancer* **133**, 556.
5. Xu, J., Prosperi, J.R., Choudhury, N., Olopade, O.I., Goss, K.H. (2015) β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* **10**, e0117097.
6. Lee, W-K., Thévenod, F. (2016) Upregulation of the multidrug resistance P-glycoprotein ABCB1 by transcription factor pituitary homeobox 2 (Pitx2) in human colon and kidney cancers. *FASEB J.* **30** (no. 1 Supplement), 439.2.
7. Maier, S., Nimmrich, I., Koenig, T., et al. (2007) DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients-Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur. J. Cancer* **43**, 1679.
8. Harbeck, N., Nimmrich, I., Hartmann, A., et al. (2008) Multicenter study using paraffin-embedded tumor tissue testing PITX2 DNA-methylation as a marker for outcome prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5036.

9. Hartmann, O., Spyrtos, F., Harbeck, N., et al. (2009) DNA-methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 315.
10. Lesche, R., Martens, J.W.M., Maier, S., et al. (2009) Identification of novel DNA-methylation markers predicting outcome in node-positive, anthracycline-treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **100** (supplement), A6009.
11. Foekens, J., Harbeck, N., König, T., et al. (2011) Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. European Patent 2011; EP 1 561 821 B1.
12. Aubele, M., Schmitt, M., Napieralski, R., et al. (2017) The predictive value of PITX2 DNA methylation for high-risk breast cancer therapy: current guidelines, medical needs, and challenges. *Disease Markers*. Article ID 4934608.
13. Fine, J.P., Gray, R.J. (1999) A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J. Am. Stat. Assoc.* **94**, 496.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2003). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; approved Guideline, first edition. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014). Evaluation of Precision of Quantitative Procedures; Approved Guideline, third edition. CLSI Document EP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline, 2nd ed. CLSI Document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto sufficiente per <N> reazioni
	Utilizzare entro
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Marchio CE per la Conformità Europea
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Global Trade Item Number
	Limite di temperatura
	Revisione del manuale, ove "n" indica il numero della revisione
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Tenere al riparo dalla luce
	Attenzione

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.
Kit <i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR: per la determinazione del rapporto percentuale di metilazione (PMR) nel promotore 2 del gene PITX2		
<i>therascreen</i> PITX2 RGQ PCR Kit (8)	Per 8 reazioni: Miscela PITX2 RGQ PCR Master Mix, miscela PITX2 RGQ PCR Primer Probe Mix, riferimento 50 PITX2 RGQ PCR, riferimento basso PITX2 RGQ PCR, controllo negativo PITX2 RGQ PCR e controllo senza template (NTC) PITX2 RGQ PCR	873211
Piattaforma Rotor-Gene Q MDx, software e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Ciclatore per PCR real-time e analizzatore HRM con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori: include garanzia di 1 anno su parti di ricambio e manodopera; installazione e formazione non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Ciclatore per PCR real-time e analizzatore HRM con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori: include garanzia di 1 anno su parti di ricambio e manodopera; installazione e formazione	9002033

Prodotto	Contenuto	N° cat.
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Software per le analisi di routine con gli strumenti Rotor-Gene Q e Rotor-Gene Q MDx.	9024203
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per configurazione manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette x 0,1 ml	9018901
72-Well Rotor	Per strisce di provette con tappo da 0,1 ml; richiede l'anello di bloccaggio per il rotore a 72 pozzetti	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Per sostenere strisce di provette e tappi da 0,1 ml sul rotore con 72 pozzetti	9018904
Rotor Holder	Supporto indipendente in metallo per l'assemblaggio di provette e Rotor-Discs® nei rotori	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
Prodotti correlati		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 colonne QIAamp MinElute, proteinasi K, tamponi, provette di raccolta	60404
Deparaffinization Solution (16 ml)	Soluzione di deparaffinazione, 16 ml	19093

Prodotto	Contenuto	N° cat.
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200)	Per 200 conversioni di DNA: Soluzione bisolfito, tampone DNA Protect, colonne spin per DNA MinElute, RNA trasportatore e tamponi	59826
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50)	Per 50 conversioni di DNA: Soluzione bisolfito, tampone DNA Protect, colonne spin per DNA MinElute, RNA trasportatore e tamponi	59824

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.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti QIAGEN non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN declina qualsiasi responsabilità per eventuali errori contenuti in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti QIAGEN sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN (e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente) è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAxpert®, EpiTect®, MinElute®, *therascreen*®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (gruppo QIAGEN); FAM™, HEX™, NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc.); TaqMan® (gruppo Roche).

Contratto di licenza limitata per il manuale del kit *therascreen* PITX2 RGQ PCR

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto 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 nessuna 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 pannello e/o ai relativi componenti.

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

Novembre 2017 HB-2370-001 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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