

Ottobre 2021

Istruzioni per l'uso di *therascreen*[®] FGFR RGQ RT-PCR Kit



Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con RNeasy[®] DSP FFPE Kit

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

CE

REF

876711



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R1 **MAT**

1125704IT

Contents

Uso previsto	5
Riassunto e spiegazione del test	6
Principio della procedura	9
Piattaforma e software.....	14
Materiali in dotazione.....	15
Contenuto del kit	15
Materiale necessario ma non in dotazione	16
Avvertenze e precauzioni	18
Precauzioni generali.....	20
Conservazione e manipolazione dei reagenti	22
Condizioni per la spedizione.....	22
Condizioni per la conservazione.....	22
Stabilità	22
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	23
Campioni FFPE.....	23
Campioni di RNA.....	23
Procedura	25
Estrazione e preparazione dell'RNA.....	25
Qualificazione e quantificazione dell'RNA.....	27
Trascrizione inversa.....	27
Real-time PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	32

Utilizzo del software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1	36
Analisi.....	48
Limitazioni della procedura.....	51
Guida alla risoluzione dei problemi.....	54
Controllo di qualità.....	55
Caratteristiche di prestazione.....	56
Limite del bianco (LoB)	56
Cutoff esame e reattività crociata	57
Reattività crociata dell'esame e specificità analitica.....	58
Limite di rilevabilità (LoD)	59
Ripetibilità e riproducibilità.....	60
Gestione dei campioni	64
Intercambiabilità da lotto a lotto.....	64
Carryover della contaminazione crociata/analitico	65
Sostanze interferenti	66
Prestazioni cliniche.....	66
Correlazione al metodo di riferimento.....	66
Risultati clinici	69
Bibliografia.....	73
Simboli.....	74
Informazioni di contatto.....	76
Informazioni per gli ordini	77
Cronologia delle revisioni del documento.....	79

Uso previsto

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è un test di real-time PCR con trascrizione inversa per il rilevamento qualitativo delle mutazioni in due punti nell'esone 7 [p.R248C (c.742C>T) e p.S249C (c.746C>G)], delle mutazioni in due punti nell'esone 10 [p.G370C (c.1108G>T) e p.Y373C (c.1118A>G)] e delle due fusioni [FGFR3-TACC3v1 e FGFR3-TACC3v3] nel gene recettore 3 del fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3) nei campioni di RNA derivati da tessuto tumorale uroteliale fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Il test è indicato per l'uso come supporto nell'identificare i pazienti con casi di cancro uroteliale (Urothelial Cancer, UC) che presentano tali alterazioni e pertanto possono essere sottoposti al trattamento con BALVERSA™ (erdafitinib).

I campioni vengono elaborati con il RNeasy DSP FFPE Kit per la preparazione manuale del campione seguita da trascrizione inversa e quindi dall'amplificazione e dall'individuazione automatizzate sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Riassunto e spiegazione del test

I recettori del fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor Receptor, FGFR) sono tirosin-chinasi (recettori transmembrana) presenti su molti tipi di cellule all'interno del corpo. Quando attivati, gli FGFR diventano fosforilati a specifici residui di tirosina che mediano l'interazione con le proteine citosoliche adattatrici e i percorsi di segnalazione intracellulari RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ e STAT. Tale percorso di segnalazione svolge notoriamente un ruolo importante nel controllo della crescita, della sopravvivenza e della migrazione cellulare (1) e pertanto rappresenta un bersaglio interessante per le terapie antitumorali.

Alterazioni dell'attivazione all'interno dei geni FGFR sono state riscontrate in un sottoinsieme di pazienti affetti da UC (2, 3), a dimostrazione dell'importanza di questo tipo di difetto genetico come fattore di sviluppo e progressione del tumore.

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è un test di real-time PCR con trascrizione inversa per il rilevamento qualitativo delle mutazioni in due punti nell'esone 7 [p.R248C (c.742C>T) e p.S249C (c.746C>G)], delle mutazioni in due punti nell'esone 10 [p.G370C (c.1108G>T) e p.Y373C (c.1118A>G)] e delle due fusioni [FGFR3-TACC3v1 e FGFR3-TACC3v3] nel gene recettore 3 del fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3) nei campioni di RNA derivati da tessuto tumorale uroteliale fissato in formalina e incluso in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Il test è indicato per l'uso come supporto nell'identificare i pazienti con casi di UC che presentano tali alterazioni e pertanto possono essere sottoposti al trattamento con BALVERSA (erdafitinib).

I campioni vengono elaborati con il RNeasy DSP FFPE Kit per la preparazione manuale del campione seguita da trascrizione inversa e quindi dall'amplificazione e dall'individuazione automatizzate sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è inoltre progettato per identificare la fusione FGFR3 FGFR3-BAIAP2L1 e le fusioni FGFR2 FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7, dal momento che i pazienti che presentano tali fusioni FGFR erano idonei alla sperimentazione clinica 42756493-BLC2001 del BALVERSA (erdafitinib). Tuttavia, il test non è approvato clinicamente per il rilevamento di queste tre fusioni. La sicurezza e l'efficacia del farmaco non sono state stabilite per i casi di UC che presentano queste fusioni e non vengono avanzate richieste per l'uso del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit come supporto nella scelta di tali pazienti per il trattamento con BALVERSA (erdafitinib).

I target di alterazione FGFR dell'esame *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono illustrati in dettaglio nella Tabella 1 e nella Tabella 2.

Tabella 1. Target degli esami *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit: Mutazioni puntiformi

Gene	Variante aminoacido	Mutazione CDS	ID Cosmic	Esoni
FGFR3	p.R248C	c.742C>T	COSM714	7
FGFR3	p.S249C	c.746C>G	COSM715	7
FGFR3	p.G370C	c.1108G>T	COSM716	10
FGFR3	p.Y373C	c.1118A>G	COSM718	10

Tabella 2. Target dell'esame *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit: Fusioni

ID fusione	Geni interessati	Breakpoint genomici	Esoni
FGFR3-TACC3v1	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1741428	11
FGFR3-TACC3v3	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1739324	10
FGFR3-BAIAP2L1 *	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	BAIAP2L1	A chr7:97991744	2
FGFR2-BICC1 *	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	BICC1	A chr10:60461834	3
FGFR2-CASP7*	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	CASP7	A chr10:115457252	2

* Il test è stato progettato per identificare la fusione FGFR3-FGFR3-BAIAP2L1 e le fusioni FGFR2-FGFR2-BICC1 e FGFR2-FGFR2-CASP7 in quanto i pazienti con queste fusioni FGFR sono idonei alla sperimentazione 42756493-BLC2001 di BALVERSA (erdafitinib). Tuttavia, il test QIAGEN non è approvato clinicamente per rilevare queste tre fusioni.

Principio della procedura

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è basato sul rilevamento mediante amplificazione selettiva di sei alterazioni FGFR3 nell'RNA estratto da campioni di UC FFPE mediante il sistema Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. La tecnologia allele specifica consente il rilevamento preciso e altamente riproducibile delle alterazioni FGFR dei target, basato sull'uso di set di primer diretti e inversi e di sonde specifici; solo una corrispondenza perfetta tra prime e sonde con il cDNA target consente l'estensione e l'amplificazione nella reazione PCR. La refertazione dei risultati è completamente automatizzata. Se i controlli eseguiti e i risultati dei campioni sono validi e si verifica l'amplificazione dei target dell'esame sufficiente sotto la soglia di cutoff nel numero di cicli predeterminata, il report mostrerà le alterazioni FGFR rilevate in ciascun campione.

Purificazione dell'RNA

I campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) sono la forma di materiale tumorale solido più ampiamente disponibile. Sebbene siano stabili e facili da trasportare e conservare, il processo di fissazione e inclusione danneggia gli acidi nucleici e li mescola con i materiali idrocarburi cerosi. Pertanto, è necessario impiegare tecniche di purificazione specialistiche per ottenere campioni idonei per l'analisi diagnostica in vitro. L'RNeasy DSP FFPE Kit è stato sviluppato specificamente per affrontare le sfide della purificazione dell'RNA dal materiale FFPE e deve essere utilizzato per preparare l'RNA che deve essere testato mediante il kit.

Trascrizione inversa

Per eseguire la procedura di test, il DNA complementare (cDNA) viene innanzitutto sintetizzato dall'RNA campione mediante trascrittasi inversa. È questo cDNA che quindi agisce come templatò iniziale nella reazione PCR analitica.

La trascrizione inversa (Reverse Transcription, RT) viene eseguita utilizzando una miscela master preparata dall'enzima della trascrittasi inversa, gli RT Buffers e la miscela di primer RT, tutti forniti con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. La reazione RT ha luogo a 42°C e viene poi interrotta dall'incubazione a 95°C.

La trascrittasi inversa è un enzima multifunzionale con tre distinte attività enzimatiche: una DNA polimerasi RNA-dipendente, una esoribonucleasi ibrido-dipendente (RNasi H) e una DNA polimerasi DNA-dipendente. Per la trascrizione inversa in vitro si utilizzano le prime due attività per produrre il cDNA a filamento singolo. L'attività di DNA-polimerasi RNA-dipendente (trascrizione inversa) trascrive il cDNA da un template di RNA, formando un ibrido DNA:RNA. Successivamente, l'attività di esonucleasi RNasi H degrada in modo specifico solo il filamento di RNA di questi ibridi (Figura 1). Pertanto, questa attività influisce sull'RNA nel cDNA, ma non ha effetto sull'RNA puro. Prima della real-time PCR, non è necessario un passaggio di degradazione distinto dell'RNA mediante l'enzima RNasi H.

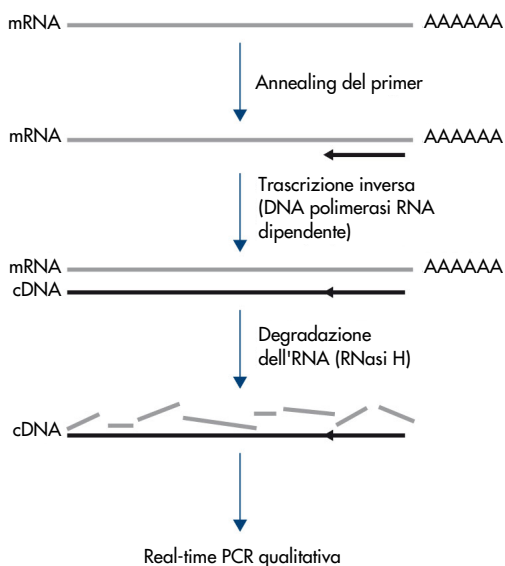


Figure 1. Sintesi del cDNA. Trascrizione inversa e sintesi del cDNA del primo filamento.

Real-time PCR

L'uso della real-time PCR consente di rilevare i prodotti della reazione durante la fase esponenziale del processo di amplificazione della PCR, piuttosto che alla fine di questo processo, come accade con la PCR endpoint. Ciò migliora la specificità del test e riduce il tempo richiesto per eseguire il processo di test.

L'esame utilizza il principio della reazione real-time PCR con idrolisi oligonucleotide con le sonde (4) TaqMan®. Per rilevare la sequenza di base di ciascun target si utilizzano tre tipi di oligonucleotidi; una coppia di primer PCR convenzionali, complementari con le sequenze a monte e a valle della sequenza target e che formano un amplicone PCR e una molecola sonda che è complementare alla sequenza target precisa e include un colorante reporter fluorescente e un quencher della fluorescenza in prossimità. L'estremità 3' della sonda è una base dideoossi, per prevenirne l'estensione ed evitare che funzioni da altro primer PCR nella reazione.

Durante la PCR, se è presente la sequenza target di interesse, la sonda oligonucleotide eseguirà l'annealing alla sequenza, mentre i primer PCR eseguiranno l'annealing alle loro sequenze complementari a monte e a valle della regione di legame della sonda. Nella fase di estensione della reazione del primer della reazione, l'attività di esonucleasi 5' - 3' della *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerasi scinde l'oligonucleotide della sonda, liberando il reporter fluorescente e le molecole del quencher. Dal momento che queste si allontanano tra loro nella soluzione, l'effetto del quencher sul reporter diminuisce, causando un aumento della fluorescenza rilevabile. Questo processo avviene a ogni ciclo PCR e non interferisce con l'accumulo esponenziale del prodotto (Figura 2).

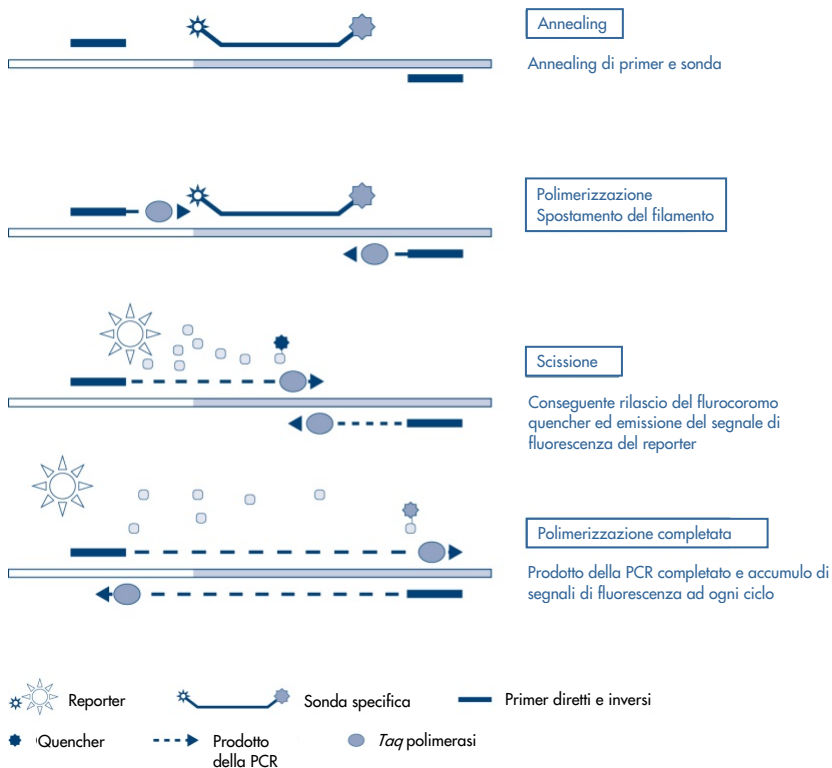


Figura 2. Il principio della reazione in TaqMan in tempo reale.

Un aumento del segnale di fluorescenza viene rilevato soltanto se la sequenza target è complementare ai primer e alla sonda ed è presente nella reazione. Se la sequenza target è assente, non avrà luogo alcuna scissione della sonda, non si verificherà alcuna dissociazione del reporter, per cui non si osserverà alcun aumento della fluorescenza. Il numero di cicli PCR necessari per individuare un segnale fluorescente al di sopra di una soglia prestabilita viene denominato soglia del ciclo (C_T) ed è direttamente proporzionale alla quantità di target presente all'inizio della reazione, consentendo di impostare un limite di sensibilità per il test.

Le miscele di reazione PCR del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit PCR contengono HotStarTaq® DNA Polymerase, una forma modificata di QIAGEN *Taq* DNA Polymerase. Viene fornito in uno stato inattivo e non presenta alcuna attività enzimatica a temperatura ambiente. Ciò impedisce la formazione di prodotti di mispriming e di dimeri di primer durante la preparazione della reazione e il primo passaggio della denaturazione. La competizione per i reagenti da parte degli artefatti PCR viene pertanto evitata, consentendo un'elevata specificità PCR. L'enzima viene attivato all'inizio di una reazione da una fase di incubazione di 15 minuti a 95°C. L'avvio a caldo consente di impostare le reazioni in modo rapido e comodo a temperatura ambiente.

Le miscele di reazione PCR del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit contengono inoltre un PCR Buffer, sviluppato specificamente per la real-time PCR multiplex, utilizzando sonde specifiche per la sequenza. Questo tampone contiene una combinazione ottimizzata specificatamente di KCl e di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, che promuove un rapporto elevato di legame al primer specifico e non-specifico durante la fase di annealing di ciascun ciclo PCR. Ciò crea stringenti condizioni di annealing dei primer, producendo un'aumentata specificità della PCR. Quando si utilizza questo buffer, l'annealing del primer viene influenzato solo marginalmente dalla concentrazione di MgCl_2 , per cui l'ottimizzazione mediante diluizione di Mg^{2+} non è richiesta. Il tampone contiene anche Factor MP sintetico, che semplifica la PCR multiplex. Il Factor MP aumenta la concentrazione locale di primer e sonde nel template di cDNA e stabilizza specificatamente primer legati e sonde, consentendo l'efficienza di annealing ed estensione. La combinazione di questi vari componenti nel PCR Buffer evita l'interferenza tra le molteplici reazioni di amplificazione.

Piattaforma e software

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è concepito specificamente per l'uso con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM installato con i seguenti software:

- Rotor-Gene AssayManager® versione 2.1
- Gamma Plug-in versione 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versione 1.0.4

Per informazioni sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, consultare il *Manuale utente di Rotor-Gene Q MDx*. La manutenzione dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM deve rispettare i requisiti descritti nel manuale utente.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Numero di catalogo		876711
Numero di reazioni		24
Contenuto	Colore del tappo	Volume
RT Buffer 1* (Tampone 1 RT)	Bianco	200 µl
RT Buffer 2† (Tampone 2 RT)	Marrone	100 µl
RT Primer Mix (Miscela di primer RT)	Viola	50 µl
Reverse Transcriptase (Trascrittasi inversa)	Blu	50 µl
Positive Control (Controllo positivo)	Rosso	100 µl
PC Diluent (Diluente PC)	Rosso	200 µl
Mutations-1 Reaction Mix‡ (Miscela di reazione delle mutazioni-1)	Arancione	720 µl
Mutations-2 Reaction Mix‡ (Miscela di reazione delle mutazioni-2)	Viola	720 µl
Fusions-1 Reaction Mix‡ (Miscela di reazione delle fusioni-1)	Giallo	720 µl
Fusions-2 Reaction Mix‡ (Miscela di reazione delle fusioni-2)	Verde	720 µl
Acqua per diluizione campioni	Trasparente	1,9 ml
Acqua per controllo senza template	Trasparente	1,9 ml
Istruzioni per l'uso (Manuale) del <i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit	–	1

* Contiene poli(etilene glicole). Per maggiori informazioni, vedere pagina 18.

† Contiene deossiribonucleasi. Per maggiori informazioni, vedere pagina 18.

‡ Miscela di reazione PCR contenente tutti i componenti necessari, tranne il campione da analizzare.

Materiale necessario ma non in dotazione

Attrezzature, materiali di consumo e reagenti per la purificazione dell'RNA

- RNeasy DSP FFPE Kit (n. cat. 73604)
- Pipette calibrate, dedicate* (regolabili) per l'elaborazione dei campioni (20 µl, 200 µl e 1 ml)
- Puntali per pipette per PCR sterili, resistenti alla contaminazione da aerosol, privi di RNasi e nucleasi, con filtri idrofobici
- Centrifuga da tavolo* con rotore per provette da 2 ml
- Miscelatore vortex*
- Etanolo 100% per biologia molecolare†
- Bisturi monouso
- Blocco riscaldante calibrato in grado di incubare a una temperatura compresa tra 56°C e 80°C di agitare a 1100 rpm

Attrezzature e materiali di consumo per trascrizione inversa e real-time PCR

- Pipette calibrate dedicate* (regolabili) per la preparazione dei campioni, la preparazione della miscela master e per dispensare l'RNA e il cDNA (20 µl, 200 µl e 1 ml)
- Puntali per pipette per PCR sterili, resistenti alla contaminazione da aerosol, privi di RNasi e nucleasi, con filtri idrofobici
- Provette per PCR con legame basso, prive di nucleasi da 1,5 ml o 2,0 ml
- 0.2 ml PCR Tubes (n. cat. 981005)
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (n. cat. 981103 o 981106)

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

† Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

- Blocco riscaldante*, bagno d'acqua* o termociclatore* in grado di incubare provette per PCR da 0,2 ml PCR a una temperatura di 42–95°C
- Sistema di raffreddamento* in grado di ospitare provette da 1,5 ml e 2,0 ml a una temperatura di 0–8°C
- Centrifuga da banco* con rotore per provette da 0,2 ml, 1,5 ml e 2,0 ml
- Miscelatore vortex
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR tubes, blocco in alluminio per la preparazione manuale delle reazioni (n. cat. 9018905)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes; blocco in alluminio per la preparazione manuale delle reazioni (n. cat. 9018901)
- 72-Well Rotor (n. cat. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (n. cat. 9018904)
- Rotor-Disc® 72 (n. cat. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (n. cat. 9018900)
- Rotor Holder (n. cat. 9018908)
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (n. cat. 9002032) o Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (n. cat. 9002033)*†
- Software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in versione 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versione 1.0.4

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

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

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

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

Per informazioni sulla sicurezza riguardanti lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, consultare il manuale utente fornito insieme allo strumento.


Per informazioni sulla sicurezza per l'RNeasy DSP FFPE Kit (n. cat. 73604), vedere il *Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit*.

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è riservato a professionisti qualificati in un ambiente di laboratorio professionale.

Per l'uso con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Per l'uso con l'RNeasy DSP FFPE Kit.

Il tasso complessivo di errore del controllo del ciclo (PC e NTC) osservato durante l'utilizzo del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è circa 5,2% (1% per PC e 4,2% per NTC). Nel caso si ottenga un risultato di analisi non valida, è necessario ripetere il test del campione come descritto in Guida alla risoluzione dei problemi, pagina 54 utilizzando l'RNA campione disponibile. Se il campione di RNA proveniente dall'estrazione FFPE è disponibile per il nuovo test è insufficiente, è necessaria una nuova estrazione dal materiale FFPE.

<p>CAUTELA</p> 	<p>NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.</p>
---	--

Ai componenti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono associate le seguenti informazioni sui rischi e misure precauzionali.

RT Buffer 1



Contiene: poli(etilene glicole). Avvertenza Può essere irritante per le vie respiratorie. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso.

RT Buffer 2



Contiene: desossiribonucleasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Precauzioni generali

Prestare sempre attenzione alle seguenti precauzioni:

Per effettuare i test RT-PCR è necessario attenersi a buone pratiche di laboratorio, come la manutenzione dell'attrezzatura, appositamente dedicata alla biologia molecolare e conforme alle leggi vigenti e ai relativi standard.

- Il test è destinato esclusivamente all'uso con campioni clinici di tessuto UC fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- Tutti i materiali chimici e biologici sono potenzialmente pericolosi e devono essere trattati di conseguenza. Sebbene sia improbabile che il materiale campione FFPE e gli acidi nucleici da esso preparati costituiscano un rischio di infezione, è necessario rispettare le procedure istituzionali locali in materia di salute e sicurezza.
- Smaltire campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I reagenti forniti con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit 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 a 25 µl.
- I reagenti forniti con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono destinati esclusivamente all'uso con altri reagenti del medesimo kit. Non sostituire alcun reagente fornito con gli stessi reagenti di un diverso lotto di produzione del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, in quanto ciò potrebbe influire sulle prestazioni.
- Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure, consultare i manuali utente dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- In caso di alterazione dei tempi e delle temperature di incubazione, i dati generati potrebbero essere erranei o discordanti.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Le miscele di reazione potrebbero degradarsi in caso di esposizione alla luce.

- Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione da carryover dell'RNA, del cDNA o del prodotto della PCR, con conseguente segnale falso positivo.
- Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione da RNasi, che può determinare la degradazione dell'RNA template e il fallimento del test.
- Utilizzare pipette singole dedicate per la preparazione delle miscele di reazione e per l'aggiunta dei template.
- Non aprire lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM finché il ciclo non è terminato.
- Non aprire le provette Rotor-Gene Q al termine della ciclo della real-time PCR.
- Assicurare che i test sui campioni vengano svolti correttamente, prestando particolare attenzione agli errori di immissione dei campioni, agli errori di caricamento e agli errori di pipettamento.
- Assicurarsi di gestire i campioni in modo sistematico e di etichettarli chiaramente, per garantire la corretta identificazione e tracciabilità degli stessi in qualsiasi momento.

È consigliabile seguire le seguenti precauzioni:

- Utilizzare strumenti di laboratorio privi di nucleasi (ad esempio pipette, puntali per pipetta, provette di reazione) e indossare i guanti durante l'esecuzione dell'esame.
- Utilizzare puntali per pipetta resistenti alla contaminazione aerosol nuovi durante tutti i passaggi di pipettamento per evitare fenomeni di contaminazione crociata dei campioni e dei reagenti.
- Maneggiare i reagenti RT e PCR con materiale di laboratorio dedicato (pipette, puntali e così via) in un'area dedicata in cui non vengano introdotte matrici di RNA o DNA (RNA, DNA, cDNA, prodotti plasmidici o della PCR). Aggiungere i campioni da analizzare in una zona separata (preferibilmente in un ambiente o in una cappa di preparazione del campione PCR separato) con attrezzature dedicate (pipette, puntali e così via).

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Condizioni per la spedizione

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit viene spedito in ghiaccio secco e deve essere congelato all'arrivo. Qualora uno dei componenti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit non dovesse essere congelato alla consegna, o la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il tragitto, oppure la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento, le Istruzioni per l'uso o i reagenti, contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Condizioni per la conservazione

Al momento della consegna, il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit deve essere conservato immediatamente a una temperatura compresa tra -30 e -15°C in un congelatore a temperatura costante e protetto dalla luce, a eccezione del Diluente PC, che deve essere rimosso dalla scatola del kit e conservato subito a una temperatura compresa tra -90 e -65°C fino alla data di scadenza indicata.

Per informazioni sulla conservazione dell'*RNeasy* DSP FFPE Kit (n. cat. 73604), vedere il *Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit*.

Stabilità

I reagenti possono essere conservati nella confezione originale a una temperatura compresa tra -30 e -15°C (a eccezione del Diluente PC, che deve sempre essere conservato a una temperatura compresa tra -90 e -65°C) fino alla data di scadenza indicata. Non superare il numero massimo di cinque cicli di congelamento/scongelo.

I reagenti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit devono essere scongelati per un minimo di 30 minuti e un massimo di 3 ore. Quando i reagenti sono pronti per l'uso, è possibile preparare le reazioni RT o PCR. Il tempo di preparazione totali per ciclo RT o PCR non deve superare le 4 ore.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Campioni FFPE

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è destinato all'uso con campioni di RNA estratti da campioni UC FFPE mediante il RNeasy DSP FFPE Kit.

Campioni di RNA

Una volta estratti, i campioni di RNA devono essere testati immediatamente con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit o conservati a una temperatura compresa tra -90 e -65°C . Non superare un massimo di cinque cicli di congelamento/scongelamento.

Per preparare i campioni di tessuto per l'estrazione dell'RNA:

- Utilizzando un microtomo tagliare sezioni seriali di $4-5\ \mu\text{m}$ dal blocco di campioni FFPE e montarle su vetrini di vetro.
- Affidare a un professionista qualificato (ad esempio un patologo) la valutazione di una sezione colorata con ematossilina eosina (EE) per confermare la presenza di tessuto tumorale e contrassegnarne i limiti. Per identificare l'area della superficie del tumore e guidare la macrodissezione nel caso in cui fosse richiesta, è necessario un vetrino adiacente alle sezioni da estrarre.
- Le sezioni colorate con ematoessilina eosina non devono essere utilizzate per l'estrazione dell'RNA.
- Conservare tutti i blocchi FFPE e i vetrini a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$).

L'input FFPE richiesto è equivalente a uno spessore del vetrino di $4-5\ \mu\text{m}$ con un'area totale della superficie del tumore compresa tra $100\ \text{mm}^2$ e $500\ \text{mm}^2$ (inclusi). Tale input può essere creato combinando il materiale di più vetrini (Figura 3).

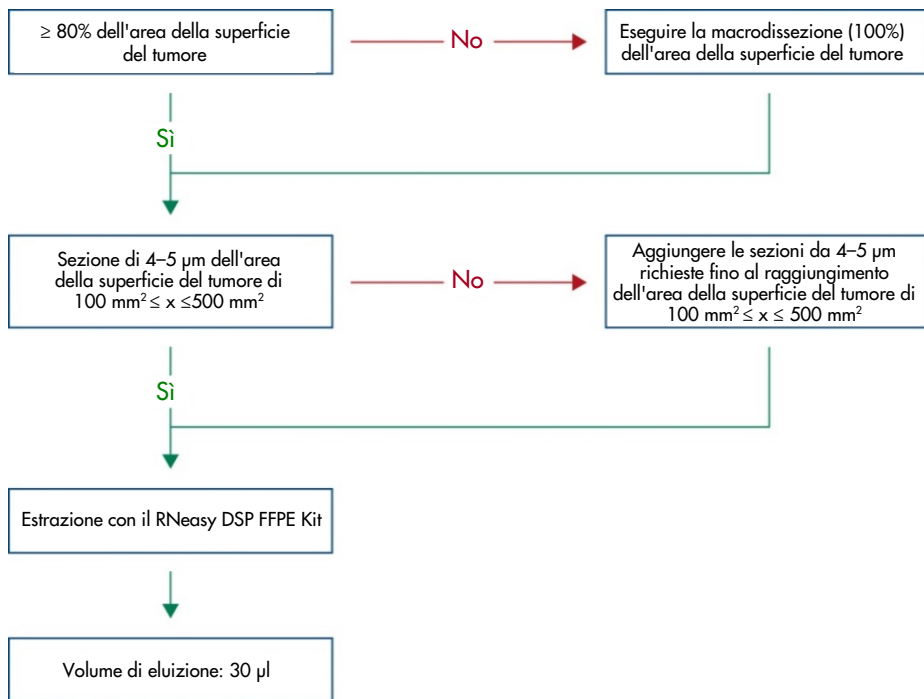


Figura 3. Flusso di lavoro di purificazione dei campioni UC clinici da utilizzare con il *theascreen* FGFR RGQ RT-PCR System.

- È necessario eseguire la macrodissezione per raggiungere almeno l'80% della superficie tumorale. Se l'area della superficie del tumore è al di sotto di 100 mm² ed è inferiore all'80%, è necessario utilizzare dei campioni aggiuntivi per raggiungere i requisiti di campione minimi.

Nota: utilizzare cura e attenzione massime nel manipolare i bisturi e accertarsi che la lama del bisturi sia puntata sempre lontano dal corpo.

Procedura

Estrazione e preparazione dell'RNA

L'RNA deve essere purificato utilizzando l'RNeasy DSP FFPE Kit (n. cat. 73604).

Assicurarsi che i reagenti da utilizzare non siano scaduti e siano stati trasportati e conservati in condizioni idonee.

Nota: le prestazioni del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono state approvate solo in combinazione con l'RNeasy DSP FFPE Kit (n. cat. 73604). Non utilizzare altri prodotti per la purificazione dell'RNA.

Punti importanti prima di iniziare

- Se si utilizza l'RNeasy DSP FFPE Kit per la prima volta, leggere le "Note importanti" nel *Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit*.
- Se si lavora con l'RNA per la prima volta, leggere "Appendice: osservazioni generali per il trattamento dell'RNA" nel *Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit*.
- Il Buffer RBC contiene un sale di guanidina, pertanto non è compatibile con i reagenti disinfettanti a base di candeggina. Per informazioni sulla sicurezza, consultare il *Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit*.
- Se non diversamente indicato, eseguire tutti i passaggi della procedura a temperatura ambiente (15-25°C). Durante la procedura, lavorare con rapidità e senza interruzioni tra un passaggio e l'altro.

- Eseguire tutti i passaggi di centrifugazione utilizzando una centrifuga tenuta a una temperatura di 15–25°C. Se si utilizza una microcentrifuga refrigerata, impostare lo strumento a temperatura ambiente, altrimenti potrebbe verificarsi un raffreddamento al di sotto dei 15°C.
- Se si utilizza il Buffer RPE e la DNasi I priva di RNasi per la prima volta, ricostituirli come descritto nel *Manuale dell'RNasy DSP FFPE Kit*.
- Equilibrare tutti i tamponi a temperatura ambiente (15-25°C). Mescolare il Buffer RPE ricostituito agitandolo.
- Impostare un blocco riscaldante con la funzione di agitazione a 56°C per utilizzarlo nei passaggi 5 e 9. Per ridurre il tempo di attesa, impostare un secondo blocco riscaldante con funzione di agitazione a 80°C per utilizzarlo nel passaggio 9.

Nota: non interrompere la procedura di purificazione tra due incubazioni in quanto il prolungarsi dei tempi di incubazione potrebbe portare a una perdita o a una degradazione dell'RNA.

Procedura

- Seguire la procedura di purificazione dell'RNA descritta nel *Manuale dell'RNasy DSP FFPE Kit*. Nel protocollo "Purificazione dell'RNA totale dalle sezioni di tessuto FFPE", accertarsi che vengano seguiti i volumi utilizzati per l'elaborazione di un numero di sezioni >3–4 (contrassegnate con ●).
- Eluire l'RNA in 30 µl RNase-Free Water fornita con il RNasy DSP FFPE Kit.
- Aliquota di 3 µl di RNA eluito per la quantificazione.
- Conservare gli eluati dell'RNA a una temperatura compresa tra -90 e -65°C.

Qualificazione e quantificazione dell'RNA

Procedura

- Risciacquare lo spettrofotometro utilizzando l'RNase-Free Water fornita con l'RNeasy DSP FFPE Kit utilizzato per l'eluizione dell'RNA.
- La quantità di RNA viene determinata misurando la densità ottica a 260 nm.
- Quantità totale di RNA isolato = concentrazione x volume di campione in μl .
- Se la concentrazione di RNA è al di sotto di 16,67 ng/ μl , il campione non deve essere elaborato ulteriormente. Per l'ulteriore analisi, è necessario utilizzare un'estrazione di RNA fresco da un campione FFPE nuovo.
- L'RNA deve essere diluito a 16,67 ng/ μl utilizzando l'acqua per il dil. campione fornito nel *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.
- La reazione di trascrizione inversa viene ottimizzata per 250 ng di RNA purificato diluito in un volume finale di 15 μl ($15 \mu\text{l} \times 16,67 \text{ ng}/\mu\text{l} = \text{input di RNA di } 250 \text{ ng}$).

Trascrizione inversa

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit fornisce rese elevate di cDNA per la rilevazione sensibile di tutti i trascritti target, persino quelli presenti in quantità ridotta. La trascrizione inversa utilizza un template di RNA e una miscela di primer complementare alle estremità 3' e 5' dell'RNA per produrre il cDNA. L'enzima della trascrittasi inversa (Reverse Transcriptase, RT) sintetizza il cDNA del primo filamento, che viene quindi utilizzato come input nella reazione PCR del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

Punti importanti prima di iniziare

- Preparare tutte le reazioni a una temperatura di 0–8°C per ridurre al minimo il rischio di degradazione dell'RNA.

- L'inibitore RNasi e i dNTP sono già inclusi nei componenti del kit. Non aggiungere altro inibitore RNasi e altri dNTP.
- È necessario utilizzare la miscela di primer (in dotazione). La miscela di primer RT è ottimizzata per fornire rese elevate di cDNA per tutte le regioni dei trascritti RNA.
- Per iniziare la reazione di trascrizione inversa, sono necessari i passaggi distinti di denaturazione e annealing.
- Dopo la trascrizione inversa, la reazione deve essere interrotta mediante incubazione a 95°C per 3 minuti, per disattivare la trascrittasi inversa.

Procedura

1. Posizionare un blocco di caricamento in grado di mantenere 96 provette per PCR da 0,2 ml e un blocco di raffreddamento in grado di mantenere un minimo di 12 provette da 2 ml a una temperatura di 0–8°C per almeno 60 minuti prima della preparazione della reazione.
2. Scongelare l'RT Buffer 1, l'RT Buffer 2, la Reverse Transcriptase, la miscela di primer RT e l'acqua per NTC forniti con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit a temperatura ambiente per un tempo compreso tra 30 minuti e 3 ore prima di iniziare la preparazione della reazione RT.
3. Scongelare i campioni di test, il PC e il Diluente PC a una temperatura di 0–8°C per un tempo compreso tra 30 e 3 ore prima di iniziare la preparazione della reazione RT.
4. Ispezionare da vicino tutti i reagenti RT per verificare che siano completamente scongelati e dissolti nella soluzione. Dissolvere eventuali precipitati nell'RT Buffer 2 tramite vortex. Se necessario, incubare brevemente il tampone a 37°C fino alla dissoluzione dei precipitati.
5. Agitare su vortex a pulsazione tutti i reagenti RT per 3 volte per 3 secondi ogni volta, in modo da garantire che i reagenti siano completamente miscelati.
6. Centrifugare brevemente tutti i reagenti RT per raccogliere il liquido residuo dai coperchi e dalle pareti delle provette.

7. Preparare una quantità di miscela master per la trascrizione inversa sufficiente per il numero di campioni da testare, più dure per i controlli dei cicli, il controllo positivo e il controllo senza template (No Template Control, NTC). La miscela master della trascrizione inversa deve essere preparato a una temperatura di 0–8°C in base alla Tabella 3.

Nota: preparare una quantità di miscela master sufficiente per 2 reazioni extra ($n + 2$) se si utilizzano ≤ 16 campioni, e quattro campioni extra ($n + 4$) se si utilizzano > 16 campioni, per consentire un volume aggiuntivo sufficiente per la preparazione della RT.

Nota: RT Buffer 1 e Reverse Transcriptase sono componenti viscosi. Pertanto, è consigliabile pipettarli lentamente.

Tabella 3. Miscela di reazione per la trascrizione inversa

Componente	Volume per reazione RT
RT Buffer 1*	5 μ l
RT Buffer 2	2,5 μ l
Miscela di primer RT	1,25 μ l
Trascrittasi inversa†	1,25 μ l
Volume totale della miscela master	10 μl

* Include Mg^{2+} e dNTP.

† Inoltre contiene l'inibitore RNasi.

8. Agitare su vortex a pulsazione la miscela di reazione RT 3 volte per 3 secondi ciascuna, per garantire che ciascun reagente sia miscelato con cura.

9. Centrifugare brevemente la miscela di reazione RT per raccogliere liquido residuo dal coperchio e dalle pareti della provetta.

10. Conservare la miscela di reazione RT nel blocco di raffreddamento.

11. Riempire il blocco di caricamento con il numero richiesto di provette per PCR da 0,2 ml.

12. Inserire un'aliquota di 10 μ l di miscela di reazione RT in ogni provetta da 0,2 ml.

13. Agitare su vortex l'acqua per il controllo senza template (No Template Control, NTC), il Diluente PC e il PC forniti con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e i campioni di RNA normalizzati per 3 volte per 3 secondi ciascuno, per essere certi che siano miscelati con cura.
14. Centrifugare brevemente l'acqua per il controllo senza template (No Template Control, NTC), Diluente PC, PC e i campioni di RNA normalizzato per raccogliere il liquido residuo dai coperchi e dalle pareti delle provette.
15. Aggiungere i campioni a ciascuna provetta contenente la miscela master per la trascrizione inversa, in base alla Tabella 4. Pipettare ciascun campione direttamente nella miscela di reazione RT della provetta; per il campione PC, pipettare innanzitutto il PC, seguito dal Diluente PC. Dopo l'aggiunta di ciascun campione, impostare la pipetta su 15 µl, pipettare in alto e in basso per 5–10 per miscelare eappare immediatamente le provette.

Nota: per proseguire in modo efficiente con la reazione RT, la miscela di reazione RT e il campione (campione PC, NTC o di test) devono essere miscelati in modo efficiente.

Tabella 4. Campione aggiunto a ciascuna miscela di reazione della trascrizione inversa

Nome campione	Tipo di campione	Volume
Controllo senza template	Acqua per controllo senza template	15 µl
Campione di test	Campione	15 µl
Controllo positivo	Controllo positivo (Positive Control, PC)	5 µl
	Diluente PC	10 µl

16. Agitare su vortex tutte le provette per 3 secondi, per garantire che i reagenti RT e il template siano miscelati.
17. Accertarsi che tutte le bolle vengano rimosse e che i reagenti RT e il template siano alla base della provetta.
18. Lasciare le provette per 15 minuti nel blocco di caricamento a temperatura ambiente.

-
19. Incubare i campioni in un blocco riscaldante, un bagno d'acqua o un termociclatore per 30 minuti a 42°C per eseguire la trascrizione inversa dell'RNA.
 20. Incubare i campioni in un blocco riscaldante, in un bagno d'acqua o in un termociclatore per 3 minuti a 95°C per disattivare l'enzima RT.
 21. Conservare i campioni di cDNA fino a quando vengono utilizzati come input per la fase PCR. Per la conservazione a breve termine, i campioni possono essere conservati a una temperatura di 2–8°C per un massimo di 5 giorni oppure a una temperatura compresa tra –30 e –15°C per un massimo di 30 giorni.

Real-time PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit fornisce la rilevazione della real-time PCR delle alterazioni FGFR in formato multiplex. Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit contiene quattro miscele di reazione PCR fornite nel formato pronto per l'uso, tra cui la HotStarTaq DNA Polymerase e il PCR Buffer.

Note importanti prima di iniziare

- La PCR deve avere inizio con un passaggio iniziale di incubazione di 15 a 95°C per attivare la HotStarTaq DNA Polymerase.

Procedura

1. Tenere un blocco di caricamento in grado di contenere 72 provette da 0,1 ml a una temperatura di 0–8°C per almeno 60 minuti prima della preparazione della reazione.
2. Scongellare le miscele di reazione PCR del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit a temperatura ambiente per un tempo compreso tra 30 minuti e 3 ore prima della preparazione della reazione PCR.
3. Agitare su vortex a pulsazione tutte le miscele di reazione PCR 3 volte per 3 ciascuna per essere certi che siano miscelate con cura.
4. Centrifugare brevemente tutte le miscele di reazione PCR per raccogliere il liquido residuo dai coperchi e dalle pareti delle provette.
5. Riempire il blocco di caricamento con il numero richiesto di strisce di provette per PCR da 0,1 ml.
6. Dispensare 20 µl di miscela di reazione PCR nelle strisce di provette per PCR da 0,1 ml, in base allo schema di pipettamento della Figura 4.

Piastra a 72 pozzetti									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Provetta 1 Mut-1	Provetta 9 Mut-1	Provetta 17 Mut-1	Provetta 25 Mut-1	Provetta 33 Mut-1	Provetta 41 Mut-1	Provetta 49 Mut-1	Provetta 57 Mut-1	Provetta 65 Mut-1
B	Provetta 2 Mut-2	Provetta 10 Mut-2	Provetta 18 Mut-2	Provetta 26 Mut-2	Provetta 34 Mut-2	Provetta 42 Mut-2	Provetta 50 Mut-2	Provetta 58 Mut-2	Provetta 66 Mut-2
C	Provetta 3 Fus-1	Provetta 11 Fus-1	Provetta 19 Fus-1	Provetta 27 Fus-1	Provetta 35 Fus-1	Provetta 43 Fus-1	Provetta 51 Fus-1	Provetta 59 Fus-1	Provetta 67 Fus-1
D	Provetta 4 Fus-2	Provetta 12 Fus-2	Provetta 20 Fus-2	Provetta 28 Fus-2	Provetta 36 Fus-2	Provetta 44 Fus-2	Provetta 52 Fus-2	Provetta 60 Fus-2	Provetta 68 Fus-2
E	Provetta 5 Mut-1	Provetta 13 Mut-1	Provetta 21 Mut-1	Provetta 29 Mut-1	Provetta 37 Mut-1	Provetta 45 Mut-1	Provetta 53 Mut-1	Provetta 61 Mut-1	Provetta 69 Mut-1
F	Provetta 6 Mut-2	Provetta 14 Mut-2	Provetta 22 Mut-2	Provetta 30 Mut-2	Provetta 38 Mut-2	Provetta 46 Mut-2	Provetta 54 Mut-2	Provetta 62 Mut-2	Provetta 70 Mut-2
G	Provetta 7 Fus-1	Provetta 15 Fus-1	Provetta 23 Fus-1	Provetta 31 Fus-1	Provetta 39 Fus-1	Provetta 47 Fus-1	Provetta 55 Fus-1	Provetta 63 Fus-1	Provetta 71 Fus-1
H	Provetta 8 Fus-2	Provetta 16 Fus-2	Provetta 24 Fus-2	Provetta 32 Fus-2	Provetta 40 Fus-2	Provetta 48 Fus-2	Provetta 56 Fus-2	Provetta 64 Fus-2	Provetta 72 Fus-2

Figura 4. Schema di pipettamento della miscela di reazione PCR. Righe A ed E (arancione): Miscela di reazione delle mutazioni-1. Righe B e F (viola): Miscela di reazione delle mutazioni-2, Righe C e G (giallo): Miscela di reazione delle fusioni-1. Righe D e H (verde): Miscela di reazione delle fusioni-2. I colori corrispondono ai tappi delle provette per PCR del kit.

7. Agitare in vortex i campioni di cDNA per 3 secondi, quindi centrifugare brevemente per raccogliere le gocce dai coperchi e dalle pareti delle provette.
8. Aggiungere 5 µl di NTC, campione di test o PC dalla reazione RT alla striscia di provette per PCR da 0,1 ml, in base allo schema di pipettamento nella Figura 5. Impostare la pipetta su 5 µl e pipettare ciascun campione in alto e in basso 5–10 volte per miscelare;appare subito le provette.

Nota: laddove possibile, l'aggiunta di template di cDNA PC alle provette deve essere eseguito in un'altra area o in un altro laboratorio, lontano dall'area o dal laboratorio utilizzato per aggiungere l'NTC e il campione di cDNA. In tal modo si riduce al minimo il potenziale di contaminazione dei campioni.

Piastra a 72 pozzetti									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Provetta 1 PC	Provetta 9 Campione 1	Provetta 17 Campione 3	Provetta 25 Campione 5	Provetta 33 Campione 7	Provetta 41 Campione 9	Provetta 49 Campione 11	Provetta 57 Campione 13	Provetta 65 Campione 15
B	Provetta 2 PC	Provetta 10 Campione 1	Provetta 18 Campione 3	Provetta 26 Campione 5	Provetta 34 Campione 7	Provetta 42 Campione 9	Provetta 50 Campione 11	Provetta 58 Campione 13	Provetta 66 Campione 15
C	Provetta 3 PC	Provetta 11 Campione 1	Provetta 19 Campione 3	Provetta 27 Campione 5	Provetta 35 Campione 7	Provetta 43 Campione 9	Provetta 51 Campione 11	Provetta 59 Campione 13	Provetta 67 Campione 15
D	Provetta 4 PC	Provetta 12 Campione 1	Provetta 20 Campione 3	Provetta 28 Campione 5	Provetta 36 Campione 7	Provetta 44 Campione 9	Provetta 52 Campione 11	Provetta 60 Campione 13	Provetta 68 Campione 15
E	Provetta 5 NTC	Provetta 13 Campione 2	Provetta 21 Campione 4	Provetta 29 Campione 6	Provetta 37 Campione 8	Provetta 45 Campione 10	Provetta 53 Campione 12	Provetta 61 Campione 14	Provetta 69 Campione 16
F	Provetta 6 NTC	Provetta 14 Campione 2	Provetta 22 Campione 4	Provetta 30 Campione 6	Provetta 38 Campione 8	Provetta 46 Campione 10	Provetta 54 Campione 12	Provetta 62 Campione 14	Provetta 70 Campione 16
G	Provetta 7 NTC	Provetta 15 Campione 2	Provetta 23 Campione 4	Provetta 31 Campione 6	Provetta 39 Campione 8	Provetta 47 Campione 10	Provetta 55 Campione 12	Provetta 63 Campione 14	Provetta 71 Campione 16
H	Provetta 8 NTC	Provetta 16 Campione 2	Provetta 24 Campione 4	Provetta 32 Campione 6	Provetta 40 Campione 8	Provetta 48 Campione 10	Provetta 56 Campione 12	Provetta 64 Campione 14	Provetta 72 Campione 16

Figura 5. Schema di pipettamento dei campioni testati con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. I colori corrispondono ai tappi delle provette per PCR del kit.

9. Accertarsi che la miscela di reazione PCR sia raccolta alla base della striscia di provette per PCR da 0,1 ml.
10. Aprire il *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versione 1.0.4 nel software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1. Per le condizioni di ciclaggio, vedere la Tabella 5.
11. Posizionare tutte e quattro le provette PCR della striscia nel rotore a 72 pozzetti. Prestare la massima attenzione per accertarsi che le provette vengano trasferite nelle posizioni corrette nel rotore a 72 pozzetti (la posizione delle provette nel rotore a 72 pozzetti deve essere la stessa della posizione delle provette nel blocco di caricamento).
Nota: tutte le posizioni libere del rotore devono essere riempite con una provetta vuota tappata. In questo l'efficienza termica dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM viene mantenuta.
12. Caricare il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Assicurarsi che l'anello bloccante (fornito con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) sia posizionato sopra al rotore, in modo da tenere ferme le provette durante il ciclo.
13. Per avviare il ciclo di real-time PCR, seguire le istruzioni fornite in "Utilizzo del software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1", a pagina 36.

Nota: le condizioni di ciclaggio dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM da utilizzare con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono illustrate in dettaglio nella Tabella 5.


Tabella 5. Condizioni di ciclaggio

Fase	Tempo	Temperatura	Commenti aggiuntivi
Fase di attivazione iniziale della PCR	15 minuti	95°C	La DNA polimerasi HotStarTaq viene attivata da questa fase di riscaldamento.
Ciclaggio a 2 fasi*:			
Denaturazione	60 sec	94°C	Passaggio di annealing/estensione combinati con raccolta dei dati di fluorescenza.
Annealing/estensione	90 sec	60°C	
Numero di cicli	45		

* Solo utilizzando queste condizioni di ciclaggio vengono assicurate prestazioni ottimali.

Utilizzo del software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1

Procedura

1. Fare doppio clic sull'icona del software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1 sul desktop del computer portatile collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. 
2. Per impostazione predefinita, compare l'ambiente "Setup" (Configurazione). Fare clic su "New manual work list" (Nuovo elenco di lavoro manuale) per creare un nuovo elenco di lavoro (Figura 6).

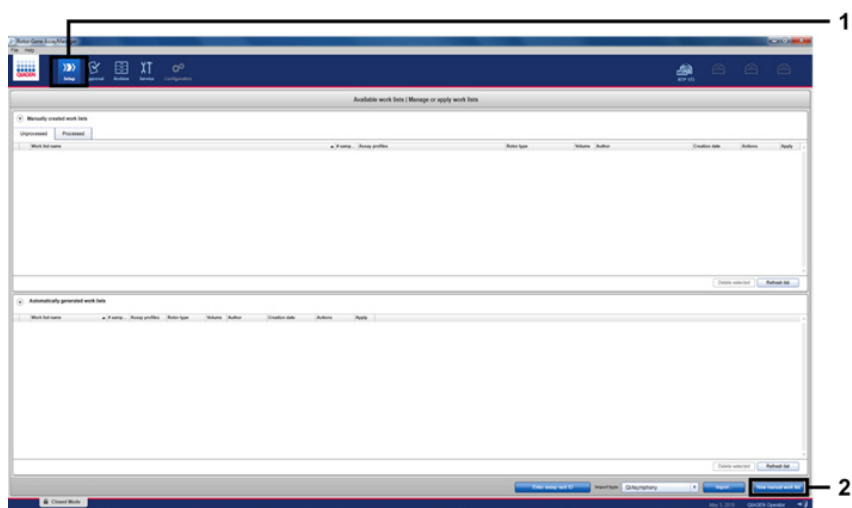


Figura 6. Configurazione del nuovo elenco di lavoro manuale. 1 = Selezionare l'ambiente "Setup" (Configurazione), 2 = "New manual work list" (Nuovo elenco di lavoro manuale).

Selezionare la scheda "Assays" (Esami) sul lato sinistro della finestra principale. Scegliere "*therascreen* FGFR FFPE Assay Profile" (Profilo dell'esame FFPE FGFR *therascreen*) dall'elenco dei profili dell'esame disponibili e fare clic sulla freccia blu per selezionare il profilo dell'esame. Se il nome del profilo dell'esame è troncato, spostare il puntatore del mouse sul profilo dell'esame per vedere il nome completo (Figura 7).

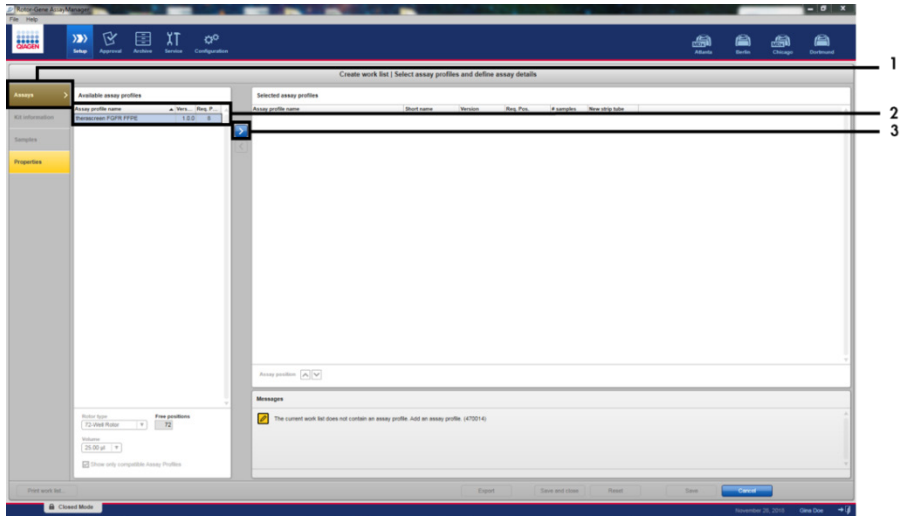


Figura 7. Configurazione del nuovo elenco di lavoro manuale; scelta del nome del profilo dell'esame.

- 1 = Scheda "Assays" (Esami),
- 2 = Selezionare "*therascreen*_FGFR_FFPE" dai profili dell'esame disponibili,
- 3 = Fare clic sulla freccia.

3. Nella finestra "Selected assay profiles" (Profili dell'esame selezionati), immettere il numero di campioni di test di cui eseguire il test, escludendo il numero di controlli del ciclo (Figura 8).

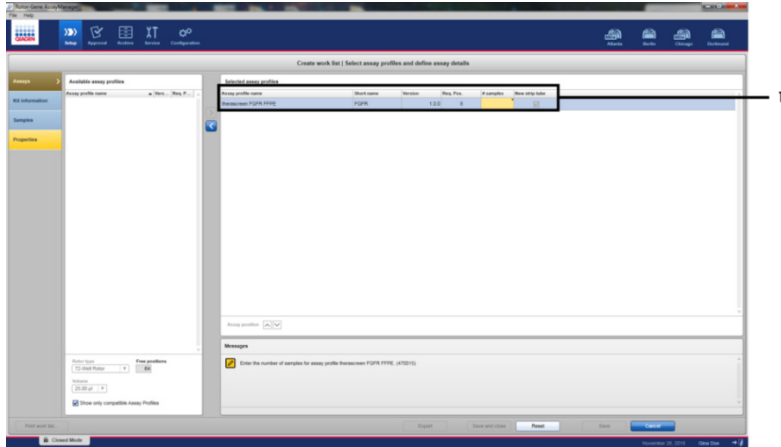


Figura 8. Finestra principale Create work list (Crea elenco di lavoro). 1 = Aggiungere il numero di campioni in "Assay profile name" (Nome profilo dell'esame).

4. Fare clic sulla scheda "Kit information" (Informazioni sul kit). Selezionare "Enter kit information manually" (Immettere manualmente le informazioni sul kit) e immettere le informazioni sul kit (Figura 9).

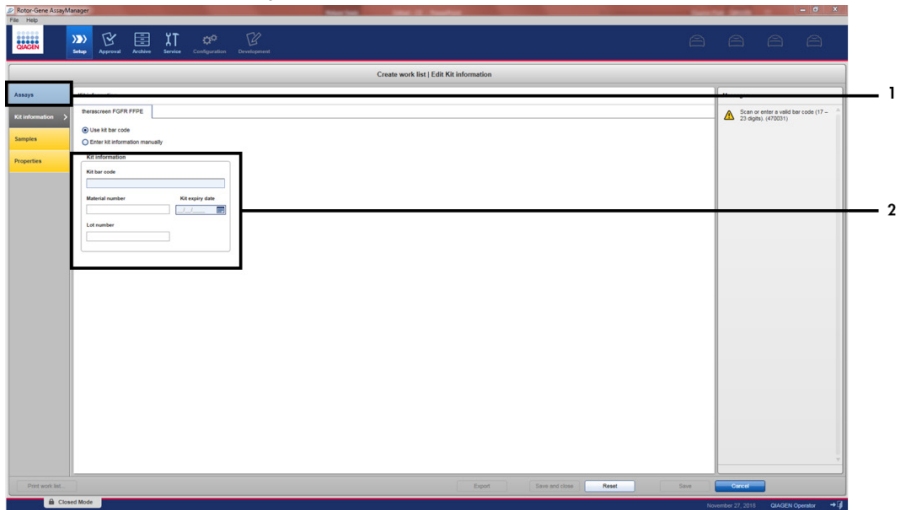


Figura 9. Finestra principale Create work list (Crea elenco di lavoro). 1 = Scheda "Kit information" (Informazioni sul kit), 2 = Immettere le informazioni sul kit.

5. Fare clic sulla scheda "Samples" (Campioni) per immettere le informazioni sui campioni. Inserire manualmente i nomi dei campioni (Figura 10).

Importante: se si utilizza un elenco di lavoro generato per un ciclo di Rotor-Gene AssayManager precedente, assicurarsi che vengano inseriti i nomi dei campioni corretti.

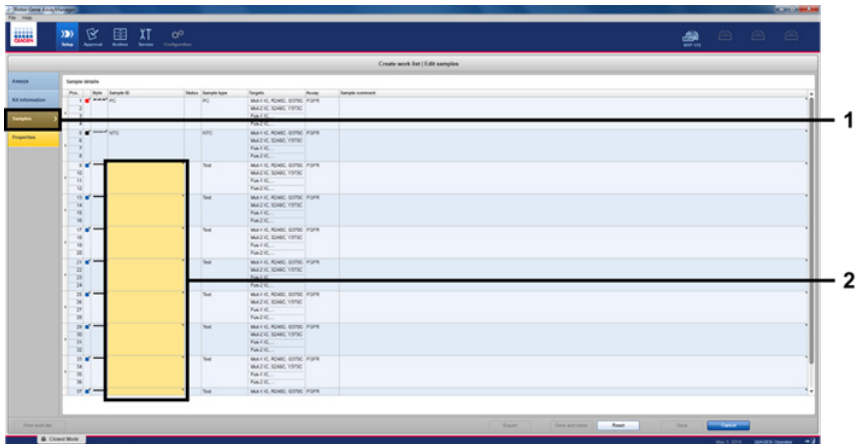


Figura 10. Finestra principale Create work list (Crea elenco di lavoro). 1 =- Scheda "Samples" (Campioni), 2 = Inserire i nomi dei campioni.

6. Fare clic sulla scheda "Properties" (Proprietà) e inserir il nome dell'elenco di lavoro. Dopo aver inserito il nome dell'elenco di lavoro, accertarsi che siano selezionate le caselle di controllo is editable (è modificabile) e work list is complete (l'elenco di lavoro è completo). Quindi, fare clic su "Apply" (Applica) nell'angolo in basso a destra per applicare l'elenco di lavoro (Figura 11).
7. Inserire il nome dell'esperimento nel campo "Experiment name" (Nome dell'esperimento). Selezionare un termociclatore dall'elenco dei termociclatori disponibili e assicurarsi che la casella di controllo Ring attached (Anello collegato) sia selezionata. Una volta eseguiti tutti i passaggi, fare clic su "Start run" (Avvia ciclo). Sotto l'icona dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM in alto a destra nella schermata comparirà un indicatore di avanzamento per indicare che il ciclo è iniziato (Figura 12).
8. Nota: l'icona "Cycler" (Termociclatore) muta il suo aspetto in funzione dello stato di avanzamento e del risultato della seduta (Figura 13). Le descrizioni complete di queste icone del ciclatore sono disponibili nel *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

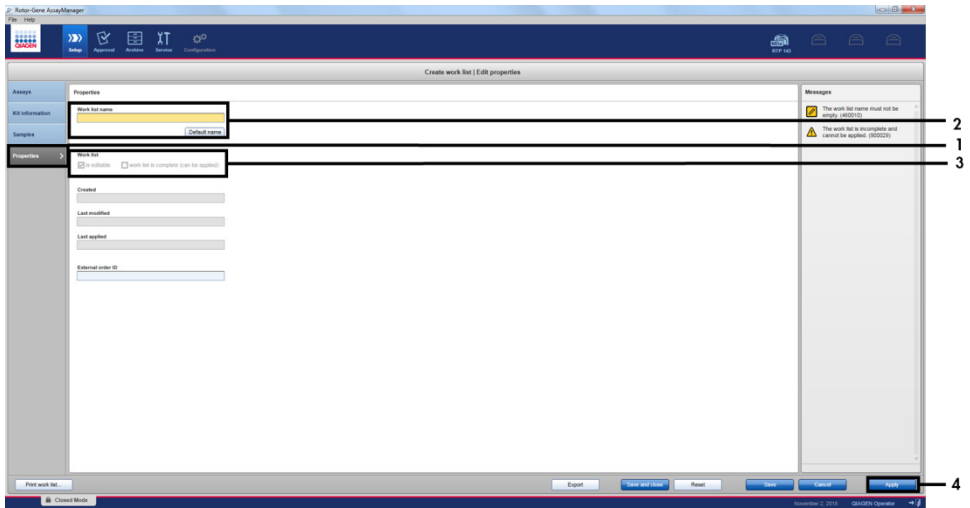


Figura 11. Finestra principale Create work list (Crea elenco di lavoro). 1 = Scheda "Properties" (Proprietà), 2 = Inserire il nome dell'elenco di lavoro, 3 = Selezionare "is editable" (è modificabile) e "work list is complete" (elenco di lavoro completo), 4 = "Apply" (Applica).

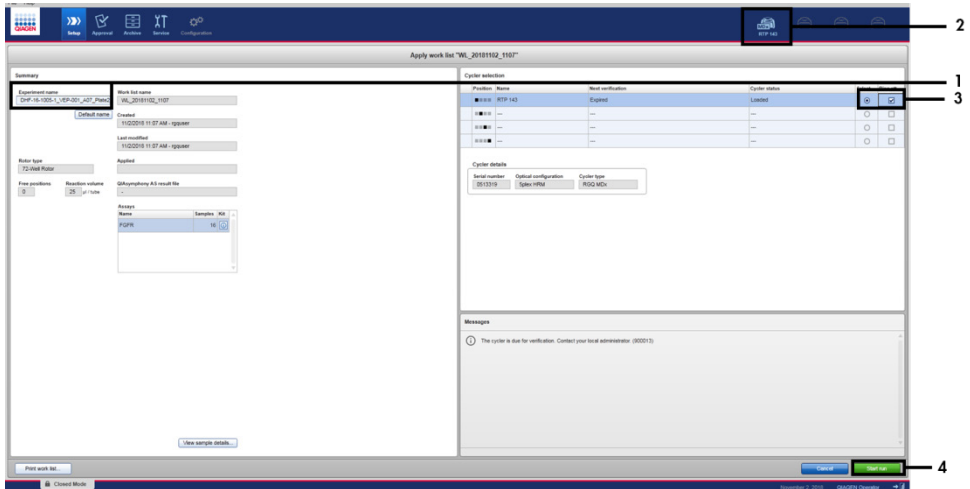


Figura 12. Applicazione dell'elenco di lavoro e avvio del ciclo. 1 = Inserire il nome dell'esperimento, 2 = Stato corrente dello strumento, 3 = Selezionare lo strumento, 4 = Avviare il ciclo.



Figura 13. Icone del Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Cyclar che possono essere visualizzate.

9. Una volta completato il ciclo, fare clic su "Finish run" (Termina ciclo) e verrà aperta la finestra di dialogo "Finish run" (Termina ciclo) (Figura 14).

Nota: durante l'esecuzione del ciclo, le curve di amplificazione saranno visualizzate e aggiornate in tempo reale. Un indicatore di avanzamento in basso a sinistra mostrerà il tempo rimanente.

Importante: quando il ciclo è in corso, non chiudere la finestra, in quanto si potrebbe verificare la perdita dei dati.



Figura 14. Completamento di un ciclo. 1 = "Finish run" (Termina ciclo).

10. Fare clic su "Release and go to approval" (Rilasciare e andare all'approvazione) per accedere all'ambiente "Approval" (Approvazione) e rilasciare lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. L'icona RGQ in alto a destra della schermata cambierà da verde a blu, indicando che lo strumento RGQ è pronto per l'esecuzione di un altro ciclo. A prescindere dalla riuscita di un ciclo, lo strumento RGQ deve essere rilasciato (Figura 15).

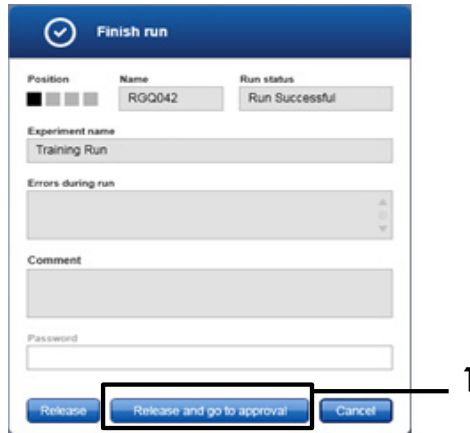


Figura 15. Finestra pop-up "Finish Run" (Termina ciclo). 1 = "Release and go to approval" (Rilascia e vai alla convalida).

Le informazioni relative a "Raw data" (Dati non elaborati), "Processed data" (Dati elaborati), "Experiment" (Esperimento), "Assay" (Esame) e "Audit trail" (Registrazione operazioni effettuate) sono disponibili nella sezione "Plots and information" (Grafici e informazioni). I risultati degli esami si possono trovare nella sezione "Results" (Risultati) (Figura 16).

Nota: il file del profilo dell'esame "*therascreen* FGFR FFPE" associato al *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit contiene tutte le istruzioni software richieste per l'analisi automatica dei campioni e l'interpretazione dei risultati. Dopo i cicli PCR, il software del Rotor-Gene AssayManager valuta automaticamente la validità dei controlli del ciclo e dei campioni. Se i dati del Controllo positivo e del Controllo senza templatò rientrano nell'intervallo accettabile prestabilito per il test, i controlli del ciclo riporteranno il risultato "Valid" (Valido). Se entrambi i controlli del ciclo sono validi, i campioni saranno analizzati su base singola; se i dati di controllo interni rientrano nell'intervallo prestabilito accettabile per il test, il campione riporterà il risultato "Valid" (Valido); se invece sono esterni all'intervallo prestabilito accettabile per il test, il campione riporterà "Invalid" (Non valido). Se i controlli esterni non rientrano nell'intervallo prestabilito accettabile per il test, verrà riportato un risultato complessivo "Invalid" (Non valido) per il campione. Se uno dei controlli del ciclo ha esito negativo, l'intero ciclo sarà invalidato. Tutti i campioni verranno quindi contrassegnati come "ASSAY_INVALID". In tal caso, vedere "Analisi" a pagina 48 per istruzioni su come procedere.

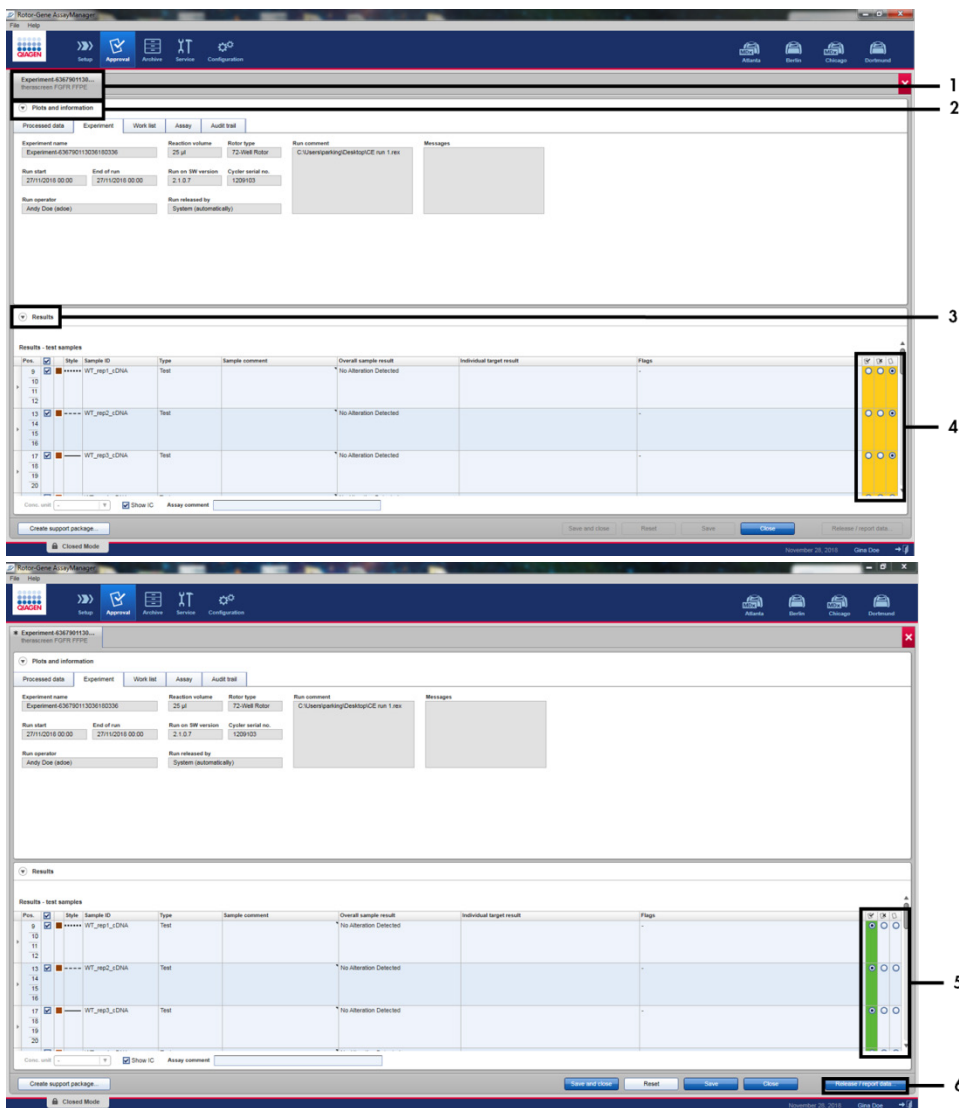


Figura 16. Esempio di finestre principali dei risultati dell'esame. 1 = Scheda "Experiment" (Esperimento). 2 = Area "Plots and information" (Grafici e informazioni). 3 = Area "Results" (Risultati). 4 = "Release/report data" (Rilascio/report dei dati). 5 = Pulsanti di opzione per accettare o rifiutare. 6 = Release/report data (Rilascio/report dei dati).

11. I risultati di tutti i campioni di test devono essere approvati (accettati o rifiutati) nell'area "Results" (Risultati) dell'ambiente "Approval" (Approvazione).
12. Fare clic su "Release /report data" (Rilascio/report dei dati). Verrà visualizzata la finestra di dialogo "Release/report data" (Rilascio/report dei dati), come mostrato nella Figura 17.
13. Fare clic su "OK" per salvare l'esperimento nell'archivio e creare un output LIMS e un report di ciclo. I report di ciclo e gli export LIM saranno salvati nella directory predefinita. La directory predefinita è disponibile in "Default data export directories" (Directory di esportazione dei dati predefinita) nella sezione "Configuration" (Configurazione) dell'ambiente software.

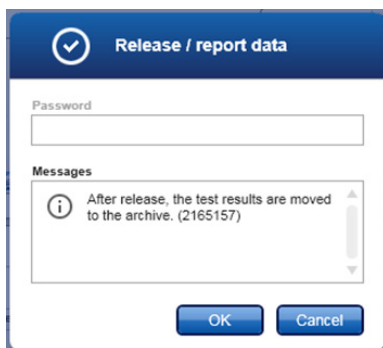


Figura 17. Finestra di dialogo "Release/report data" (Rilascio/report dei dati).

14. Per visualizzare un esperimento conservato nell'archivio degli esperimenti, fare clic sull'ambiente "Archive" (Archivia) e cercare l'esperimento utilizzando il criterio di ricerca nella sezione "Filter Options" (Opzioni filtro). Fare clic su "Apply filter" (Applica filtro) per cercare. Scegliere un esperimento selezionando la casella di controllo accanto all'esperimento che si desidera visualizzare, quindi fare clic su "Show assays" (Mostra esami) (Figura 18).

1.5. Se un esperimento ha esito negativo e viene visualizzato un codice di errore, un elenco di potenziali problemi e codici di errore che è possibile presentare da Rotor-Gene AssayManager è contenuto all'interno del *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager v2.1* e/o del *Manuale utente del Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

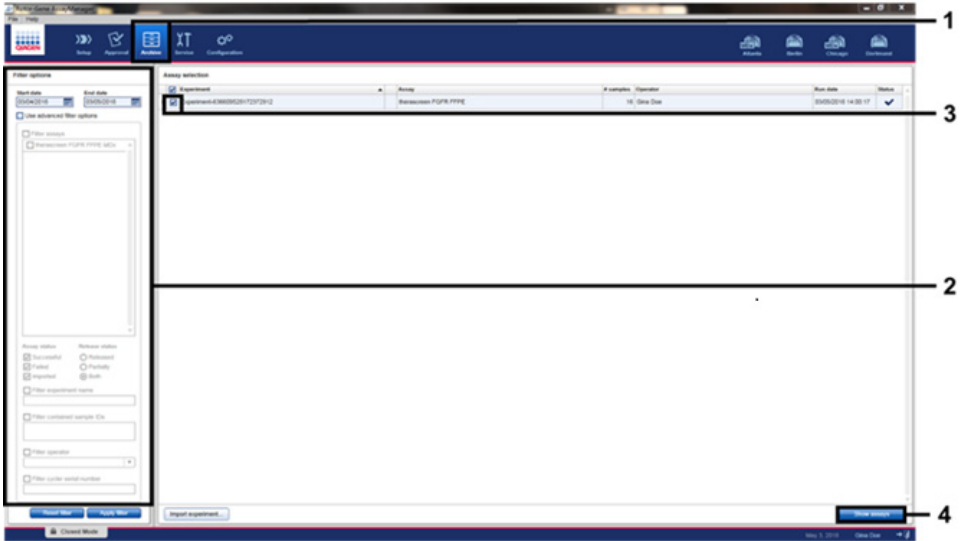


Figura 18. Finestra principale "Experiment Archive" (Archivio esperimenti). 1 = Scelta della selezione ambientale "Archive" (Archivio), 2 = Opzioni di ricerca, 3 = scelta del nome dell'esperimento, 4 = "Show assays" (Mostra esami).

Analisi

Tutti i passaggi dell'analisi dei dati vengono eseguiti automaticamente, senza requisiti per l'interpretazione manuale. Rotor-Gene AssayManager controlla automaticamente i criteri di validità del processo e di validità del campione e i risultati dello stato della mutazione e non segnalerà i risultati dello stato della mutazione in caso di ciclo o di campione non valido. Il risultato analitico viene determinato combinando tutti i dati relativi alla PCR in base agli algoritmi dell'analisi principale definiti nel profilo dell'esame *therascreen* FGFR FPPE.

Innanzitutto, vengono eseguite le analisi dei controlli del ciclo:

- Viene verificata la presenza di amplificazione all'interno degli esami dei controlli positivi e degli esami IC nella reazione PC. Questo controllo del ciclo è valido se il valore C_T di ciascun PC rientra nelle relative specifiche PC.
- Viene controllata l'assenza di amplificazione specifica della reazione NTC all'interno degli esami di controllo senza template e degli esami IC. Tale controllo di ciclo è valido se non si osserva alcun valore C_T o se il valore di C_T è al di sopra della specifica NTC.

Se uno qualsiasi di tali controlli non rispetta le specifiche, il ciclo verrà reso non valido e sarà necessario eseguire l'analisi nuovamente a partire dal passaggio di trascrizione inversa.

Se tutte le analisi di controllo eseguite rispettano le specifiche, viene eseguita l'analisi delle reazioni da campione. Sulla base di valori C_T , lo status di alterazione del gene FGFR di ciascun campione cDNA è qualitativamente determinato e segnalato.

I seguenti risultati possono essere assegnati a un singolo individuo:

- FGFR Alteration Detected ("Valid") (Alterazione FGFR rilevata ("Valido"))
- No Alteration Detected ("Valid") (Nessuna alterazione rilevata ("Valido"))
- NON VALIDO: Se uno o più flag vengono assegnati al campione durante l'analisi del Rotor-Gene AssayManager v2.1 che dovrebbe impostare il risultato dell'alterazione FGFR to "INVALID" (NON VALIDO)

Nota: un tumore può contenere più alterazioni FGFR. In tali circostanze, saranno segnalate più alterazioni FGFR.

Nota: nel report generato al termine del ciclo, i risultati ottenuti con i controlli eseguiti sono visualizzati con gli avvisi (flag) invalidanti davanti ai dati non validi. Se si verifica un errore durante il ciclo del Rotor-Gene Q, i campioni nello strumento devono essere scaricati ed è necessario eseguire il test di ripetizione dal campione di RNA estratto.

Tutti i flag possibili corrispondenti al Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in sono elencati nel *Manuale utente di Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*. Ulteriori flag, specifici del "therascreen_FGFR_FFPE" Assay Profile sono mostrati in Tabella 6.

Tabella 6. Flag software di esempio che possono essere visualizzati

Flag software	Caso in cui viene visualizzato il flag	Azione consigliata
PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	PC al di sopra dell'intervallo di specificazione	Ciclo non valido. Ripetizione del test dall'RNA estratto, se disponibile oppure dall'RNA estratto nuovamente.
PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	PC al di sotto dell'intervallo di specificazione	Ciclo non valido. Ripetizione del test dall'RNA estratto.
PC_NO_CT_VALUE	Nessun valore C_T per PC nelle provette di PC	Ciclo non valido. Ripetizione del test dall'RNA estratto.
NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	Valore C_T rilevato nell'NTC	Ciclo non valido. Ripetizione del test dall'RNA estratto.
(Alterazione) IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Campione al di sopra dell'intervallo di specificazione	Campione non valido. Nuova estrazione del campione.
(Alterazione) IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Campione al di sotto dell'intervallo di specificazione	Campione non valido. Nuova estrazione del campione.
(Alterazione) IC_NO_CT_VALUE	Nessun valore C_T per il campione	Campione non valido. È possibile ripetere il test dall'RNA estratto oppure è necessario estrarre nuovamente il campione.
(Alterazione) UNEXPECTED_EARLY_CT	La curva di amplificazione ha superato la soglia all'inizio del ciclo	Risultato anomali del campione. Ripetere il test dall'RNA estratto.

Nota: se vengono ottenuti cicli non validi ripetuti, contattare il supporto tecnico QIAGEN.

Limitazioni della procedura

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

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit deve essere utilizzato esclusivamente per il test dell'RNA derivato da campioni di tumori UC FFPE.

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit deve essere utilizzato esclusivamente per il test dell'RNA preparato mediante il RNeasy DSP FFPE Kit (n. cat. 73604).

Il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è inoltre progettato per identificare la fusione FGFR3 FGFR3-BAIAP2L1 e le fusioni FGFR2 FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7, in quanto i pazienti di queste fusioni FGFR erano idonei per la sperimentazione clinica 42756493-BLC2001 del BALVERSA (erdafitinib). Tuttavia, il test non è approvato clinicamente per rilevare queste tre fusioni a causa dell'assenza dei campioni clinici richiesti. La sicurezza e l'efficacia del farmaco non sono state stabilite per i casi di UC che presentano queste fusioni e non vengono avanzate richieste per l'uso del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit come supporto nella scelta di tali pazienti per il trattamento con BALVERSA (erdafitinib).

I campioni con risultati di "No Alteration Detected" (Nessuna alterazione rilevata) possono presentare alterazioni FGFR che non vengono rilevate dal *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

Il rilevamento delle alterazioni FGFR dipende dall'integrità del campione e dalla quantità di cDNA amplificabile che è possibile ricavare dal campione.

Se l'esame del controllo interno (Internal Control, IC) per un particolare campione non presenta un valore C_T o tale valore è esterno all'intervallo specificato, la procedura di test per questo campione deve essere ripetuta.

Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale adeguatamente preparato e specializzato nelle procedure di diagnostica in vitro e nel funzionamento dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso sul termociclatore per real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Per ottenere risultati ottimali, è necessario osservare scrupolosamente le *Istruzioni per l'uso del theascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit*. La diluizione dei reagenti, salvo con le modalità descritte in questo manuale, è sconsigliata in quanto potrebbe determinare un decadimento delle prestazioni.

Le istruzioni fornite in questo manuale devono essere utilizzate con il software Rotor-Gene AssayManager versione 2.1 con stato di alterazione FGFR automatizzato che richiede l'utilizzo congiunto di Gamma Plug-in versione 1.0.0 e *theascreen FGFR FFPE Assay Profile* versione 1.0.4.

Il *theascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* non dimostra reattività crociata rilevabile (presente in un report "Alteration Detected" (Alterazione rilevata)) tra gli esami di alterazione dei geni FGFR che include.

Il *theascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* fornisce un risultato di test qualitativo, generando una classificazione dei risultati positiva o negativa per ciascuna alterazione FGFR.

Il *theascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* utilizza una procedura RT-PCR a due fasi. Come accade con tutte le procedure simili, i campioni potrebbero essere contaminati da fonti esterne all'interno dell'ambiente di test o potenzialmente dal controllo positivo. Gli operatori del test devono prestare molta attenzione per evitare la contaminazione dei campioni e dei reagenti del kit.

L'effetto della contaminazione microbica sulle prestazioni del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è sconosciuto; gli operatori devono prestare la massima attenzione per evitare l'introduzione di contaminanti microbici durante le procedure di test e non devono utilizzare i componenti del kit se vengono osservati segnali di crescita microbica.

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.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del supporto tecnico di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Il campione NTC mostra un risultato non valido

Si è verificato il rilevamento di un target di esame in assenza del materiale del template

Ripetere il test dalla fase RT utilizzando il campione di RNA, se disponibile. Se il campione di RNA non è disponibile, ripetere il test dalla fase di estrazione dell'RNA.
Se possibile, chiudere le provette per PCR subito dopo l'aggiunta del campione da testare.
Assicurarsi che lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

Il campione di PC mostra un risultato non valido

- | | |
|--|---|
| a) Configurazione non corretta della RT o della PCR | Controllare le fasi operative eseguite con lo schema di pipettamento e ripetere dalla fase di RT, se necessario. |
| b) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni fornite in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" (pagina 22) | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta del kit) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |
| c) Il <i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit è scaduto | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta del kit) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo kit. |

Commenti e suggerimenti

Il controllo interno (Internal Control, IC) mostra un risultato non valido

L'IC è al di fuori dell'intervallo prestabilito accettabile; la qualità del campione di RNA non è idonea per il test con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit

Ripetere l'estrazione dell'RNA se è disponibile una quantità di tessuto FFPE sufficiente.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO (ISO 13485), ogni lotto del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto.

Caratteristiche di prestazione

Limite del bianco (LoB)

Il limite del bianco (LoB) è definito nella linea EP17-A2 del CLSI come "il risultato più alto che è ragionevole attendersi da un campione bianco (vale a dire, un campione con concentrazione vicina o pari allo zero) per una data probabilità di errore α ". Per il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, questo valore coincide con il punto di dati corrispondente al 95° percentile superiore nei campioni negativi all'alterazione FGFR. Il limite di bianco è stato determinato misurando i livelli di interferenza per ciascuno dei nove esami di alterazione FGFR del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, dove l'interferenza è definita come amplificazione non specifica a livello basso di un campione di RNA negativo all'alterazione FGFR. Il limite di bianco è stato determinato mediante l'analisi di 60 campioni clinici wild-type, utilizzando 180 punti di dati per esame, tra tre lotto di *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e tre strumenti. Il limite di bianco per ciascun esame del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è mostrato nella Tabella 7.

Tabella 7. Riepilogo dei risultati del limite del bianco

Esame FGFR	Limite del bianco (valore Ct)
p.R248C (c.742C>T)	39,64
p.S249C (c.746C>G)	Nessuna amplificazione
p.G370C (c.1108G>T)	Nessuna amplificazione
p.Y373C (c.1118A>G)	Nessuna amplificazione
FGFR3-TACC3v1	Nessuna amplificazione
FGFR3-TACC3v3	Nessuna amplificazione
FGFR3-BAIAP2L1 *	Nessuna amplificazione
FGFR2-BICC1 *	Nessuna amplificazione
FGFR2-CASP7*	Nessuna amplificazione

* La fusione FGFR3 FGFR3-BAIAP2L1 e le fusioni FGFR2 FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7 non sono state approvate analiticamente con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e i campioni clinici.

Cutoff esame e reattività crociata

Cutoff esame

Il valore di cutoff dell'esame è un valore C_T specifico utilizzato per stabilire se un campione è classificato come positivo o negativo per un'alterazione FGFR. I campioni che generano valori C_T di cutoff o al di sotto sono classificati come positivi all'alterazione FGFR (vale a dire alterazione FGFR rilevata), mentre i valori C_T generati al di sotto del cutoff sono classificati come negativi all'alterazione FGFR (vale a dire nessuna alterazione rilevata). I tassi di falso negativo e falso positivo per ciascun esame sono stati utilizzati per stabilire un valore di cutoff per ciascun esame specifico dell'alterazione FGFR, in modo che un risultato uguale o inferiore al cutoff generi una classificazione di alterazione FGFR rilevata. Il cutoff per ciascun esame all'interno del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è mostrato nella Tabella 8.

Tabella 8. Riepilogo dei risultati di cutoff dell'esame

Esame FGFR	Cutoff dell'esame (valore C_T)
p.R248C (c.742C>T)	36,00
p.S249C (c.746C>G)	39,09
p.G370C (c.1108G>T)	41,00
p.Y373C (c.1118A>G)	43,00
FGFR3-TACC3v1	43,00
FGFR3-TACC3v3	43,00
FGFR3-BAIAP2L1 *	43,00
FGFR2-BICC1 *	43,00
FGFR2-CASP7*	42,00

* La fusione FGFR3 FGFR3-BAIAP2L1 e le fusioni FGFR2 FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7 non sono state approvate analiticamente con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e i campioni clinici.

Reattività crociata dell'esame e specificità analitica

Reattività crociata dell'esame

La reattività crociata dell'esame è definita come amplificazione non specifica di un'alterazione FGFR mediante i reagenti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, diversa dal target previsto di un esame, che restituisce un valore C_T al di sotto del cutoff selezionato per tale esame. Campioni con livelli elevati di alterazione FGFR sono stati testati con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e in nessuno degli esami è stata osservata alcuna amplificazione off-target al di sotto del cutoff. Pertanto, tra gli esami per le alterazioni FGFR che costituiscono il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, non è stata osservata alcuna reattività crociata.

Specificità analitica

Il livello di reattività crociata potenziale tra primer, sonde e inibitori utilizzati nel *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e i target non *FGFR* all'interno di genomi umani e non, e il livello di potenziale formazione di eterodimero sono stati studiati. È stata eseguita un'analisi in silico per stabilire se i primer, le sonde e gli inibitori utilizzati con gli esami del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit legassero in modo non specifico all'interno di qualsiasi genoma, incluso il genoma umano. Un'ulteriore analisi in silico è stata eseguita per stabilire se gli oligonucleotidi utilizzati all'interno di ciascun esame multiplex legassero in modo non specifico tra loro.

L'analisi in silico degli eterodimeri di oligo ha indicato una bassa prevalenza della formazione di eterodimeri. I primer e le sonde non presentano reattività crociata con gli alleli *FGFR* wild-type o altre alterazioni FGFR non rilevate dal *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e pertanto non genereranno un segnale falso.

Limite di rilevabilità (LoD)

Il limite di rilevabilità è definito come il numero minimo di copie RNA di alterazione *FGFR*/μl per ciascun target che è possibile rilevare con una probabilità del 95%. Per gli esami specifici dell'alterazione *FGFR* del *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit, il limite di rilevabilità è riportato come copie di RNA dell'alterazione *FGFR*/μl. Le singole alterazioni *FGFR* nelle trascrizioni in vitro, una per ciascuna alterazione, sono state esaminate in un pool di RNA normalizzato estratto da campioni clinici wild-type e diluiti in modo seriale ai livelli superiore, uguali o inferiori al valore del limite di rilevabilità stimato per ciascun esame.

Sessanta replicati di ciascun punto di diluizione nella serie sono stati testati utilizzando tre lotti di *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit. Il limite di rilevabilità per ciascun esame è stato determinato utilizzando un modello Probit e riportato come limite di rilevabilità più elevato per numero di copie di RNA/μl (vale a dire, il caso peggiore) tra i tre lotti di *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit testati (Tabella 9).

Tabella 9. Riepilogo dei risultati del limite di rilevabilità

Esame <i>FGFR</i>	Limite di rilevabilità (copie/ml)
p.R248C (c.742C>T)	75,80
p.S249C (c.746C>G)	289,82
p.G370C (c.1108G>T)	141,57
p.Y373C (c.1118A>G)	274,71
<i>FGFR3</i> - <i>TACC3v1</i>	25,26
<i>FGFR3</i> - <i>TACC3v3</i>	45,75
<i>FGFR3</i> - <i>BAIAP2L1</i> *	9,07
<i>FGFR2</i> - <i>BICC1</i> *	14,34
<i>FGFR2</i> - <i>CASP7</i> *	27,18

* La fusione *FGFR3* *FGFR3*-*BAIAP2L1* e le fusioni *FGFR2* *FGFR2*-*BICC1* e *FGFR2*-*CASP7* non sono state approvate analiticamente con il *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit e i campioni clinici.

I limiti di rilevabilità degli esami p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 e FGFR3-TACC3v3 sono stati verificati utilizzando campioni UC clinici positivi all'alterazione FGFR.

Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità (all'interno del laboratorio) del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit è stata valutata mediante il test di campioni artificiali a valori 3 volte superiore al limite di rilevabilità, rappresentando le nove alterazioni rilevate dal *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e un campione negativo all'alterazione *FGFR*.

La ripetibilità è stata valutata mediante il test di questi campioni in un unico sito per più giorni, con più strumenti Rotor-Gene Q e operatori, in modo da generare un totale di 60 replicati per campione (Tabella 10).

Tabella 10. Ripetibilità dell'esame: numero di classificazioni corrette e limiti di confidenza al 95% bilaterale per ciascuna alterazione FGFR a un valore 3 volte superiore al limite di rilevabilità e campioni wild-type testati in un unico sito

Templato	N. di classificazioni corrette	Percentuale di classificazioni corrette	Limite inferiore di confidenza al 95% bilaterale	Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale
p.R248C (c.742C>T)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.S249C (c.746C>G)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.G370C (c.1108G>T)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.Y373C (c.1118A>G)	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR3-TACC3v1 *	59/60	98,3%	91,06%	99,96%
FGFR3-TACC3v3	59/60	98,3%	91,06%	99,96%
FGFR3-BAIAP2L1	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR2-BICC1	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR2-CASP7	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (miscela di reazione mut-1)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (miscela di reazione mut-2)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (miscela di reazione fus-1)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (miscela di reazione fus-2)	59/60	98,3%	91,06%	99,96%

* Da campioni 1 volta il valore del limite di rilevabilità.

La riproducibilità è stata misurata mediante il test dei campioni artificiali a un valore 3 volte il limite di rilevabilità, dei campioni clinici vicini al limite di rilevabilità e dei campioni wild-type tra tre siti diversi (un sito QIAGEN interno nel Regno Unito e altri due siti esterni negli Stati Uniti). I campioni artificiali per tutte le alterazioni FGFR a 3 volte il limite di rilevabilità e i campioni wild-type sono stati sottoposti a test da tre operatori (per sito) per oltre cinque giorni utilizzando tre strumenti Rotor-Gene Q MDx in ciascun sito esterno. Inoltre, l'RNA estratto dai campioni clinici UC fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) sono stati utilizzati per il test della riproducibilità del dispositivo. Il test è stato eseguito a un livello di limite di rilevabilità per ciascun target [p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 e FGFR3-TACC3v3] utilizzando dei campioni clinici. Non è stato possibile ottenere campioni clinici per FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 o FGFR2-CASP7. L'analisi inoltre combinava la variabilità da lotto a lotto all'interno del progetto dello studio. Tutti i campioni clinici con 1 volta il valore del limite di rilevabilità sono stati testati in ciascuno dei tre siti utilizzando il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (due replicati biologici x due lotti di *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit x due operatori x tre giorni = 24 replicati per ciascun sito). Il totale di questi replicati è stato testato su tre strumenti Rotor-Gene Q MDx in ciascun sito, e due dei tre lotti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono stati utilizzati in modo alternato in ciascun sito (Tabella 11).

Tabella 11. Riproducibilità dell'esame: numero di classificazioni corrette e limiti di confidenza al 95% bilaterale per ciascuna alterazione FGFR a un valore pari al limite di rilevabilità, 3 volte il limite di rilevabilità e campioni wild-type testati in tutti i siti

Mutazione	Livello target	Tipo di campione	N. di risultati di classificazioni corrette	Percentuali di classificazioni corrette	Limite inferiore di confidenza al 95% bilaterale	Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale
p.R248C (c.742C>T)	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	72/72	100,00%	95,01%	100,00%
p.S249C (c.746C>G)	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	72/72	100,00%	95,01%	100,00%
p.G370C (c.1108G>T)	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
p.Y373C (c.1118A>G)	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
FGFR3- TACC3v1	1xLoD	Artificiale	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	1/3xLoD	Clinico	63/72	87,50%	77,59%	94,12%
FGFR3- TACC3v3	3xLoD	Artificiale	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	1xLoD	Clinico	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
FGFR3- BAIAP2L1*	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	NA	NA	NA	NA
FGFR2- BICC1*	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	NA	NA	NA	NA
FGFR2- CASP7*	3xLoD	Artificiale	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1xLoD	Clinico	NA	NA	NA	NA
WT (Mut-1)	NA	Clinico	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Mut-2)	NA	Clinico	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Fus-1)	NA	Clinico	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Fus-2)	NA	Clinico	116/120	96,67%	91,69%	99,08%

*Non è stato possibile ottenere campioni clinici UC FFPE per queste alterazioni. NA: non valutato.

Gestione dei campioni

Il presente studio ha valutato la variabilità nella gestione dei campioni, in modo specifico durante la fase di estrazione dell'RNA. I campioni clinici UC FFPE sono stati suddivisi in tre serie indipendenti da estrarre con il RNeasy DSP FFPE Kit in tre laboratori indipendenti. Ciascuna serie conteneva un numero predefinito di campioni wild-type FGFR e di campioni FGFR positivi (vale a dire, in cui era stata rilevata l'alterazione FGFR). Tutti i campioni sono stati predisposti per essere eseguiti in cieco prima dell'estrazione. Ciascuna serie è stata estratta tre volte da due operatori in tre siti. Tutti i campioni di RNA sono stati quindi sottoposti a test utilizzando il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit in un solo sito.

Tra tutte le alterazioni FGFR, la proporzione di classificazioni corrette è stata del 96,22%, supportando la riproducibilità e la ripetibilità per il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR System nella fase preanalitica dell'isolamento dell'RNA.

Intercambiabilità da lotto a lotto

Il presente studio ha risolto il potenziale della variabilità da lotto a lotto di compromettere il rilevamento dell'alterazione *FGFR* da parte del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. L'FGFR System utilizza due kit distinti: l'RNeasy DSP FFPE Kit per l'isolamento dell'RNA dai campioni clinici FFPE UC e il *therascreen* FGFR RGQ-RT-PCR Kit per l'amplificazione e il rilevamento delle alterazioni FGFR.

L'intercambiabilità tra i lotti è stata dimostrata utilizzando tre lotti dell'RNeasy DSP FFPE Kit e tre lotti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Per questo studio è stata utilizzata una combinazione di campioni clinici e artificiali. Quattro campioni clinici FFPE con alterazioni FGFR3-TACC3v1 p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G) e un campione clinico FFPE wild-type sono stati estratti in duplicato utilizzando tre lotti dell'RNeasy DSP FFPE Kit e sottoposti a test con tre diversi lotti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR. Inoltre, i campioni artificiali per l'alterazione FGFR3-TACC3v3, FGFR3-BAIA2PL1, FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7 p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G) sono stati prodotti a un livello 3 volte il limite di rilevabilità e sottoposti a test con tre lotti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Tutti i campioni sono stati normalizzati e diluiti a un livello pari a tre volte il limite di rilevabilità per ciascun esame. In totale sono stati generati 36 replicati per ciascun campione. La percentuale complessiva di classificazioni corrette per tutti i campioni tra tutti i lotti del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e dell'RNeasy DSP FFPE Kit è stata del 99,65% (286 campioni su 287).

Carryover della contaminazione crociata/analitico

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit per il carryover in caso di test di campioni positivi all'alterazione *FGFR* accanto a campioni negativi all'alterazione *FGFR*. Lo studio ha esaminato l'intero FGFR System dall'estrazione all'amplificazione PCR e ha investigato se il carryover si è verificato tra campioni, estrazioni e all'interno di un ciclo o tra cicli.

I campioni clinici FFPE UC sono stati suddivisi in due serie indipendenti. Entrambe le serie includevano 18 campioni wild-type e 12 campioni positivi all'alterazione *FGFR*. L'estrazione dell'RNA, la preparazione della reazione RT e PCR ha seguito una matrice progettata per introdurre il rischio di contaminazione crociata del campione. Ogni serie è stata sottoposta a test da un operatore diverso, utilizzando lo stesso lotto del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Sono stati sottoposti a test 128 replicati wild-type e la percentuale di classificazioni false positive per i campioni wild-type è stata del 3,13% (4 campioni su 128).

Sostanze interferenti

Questo studio ha investigato l'impatto di potenziali interferenti endogeni ed esogeni sul rilevamento dello stato di alterazione *FGFR* tra il RNeasy DSP FFPE Kit e il *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit. Ai campioni è stato aggiunto un numero di interferenti variabile da uno a quattro (emoglobina, Buffer RPE, Deparaffinization Solution o cera di paraffina), durante la fase di estrazione o quella di normalizzazione del campione di RNA. È stato sottoposto a test un totale di 60 replicati per interferente in ciascuno dei nove campioni positivi all'alterazione *FGFR* e sono stati testati i campioni wild-type. I quattro interferenti non hanno mostrato differenze significative dal punto di vista statistico nei risultati tra i campioni di controllo e i campioni di test, e la presenza di interferenti non ha influito sulle prestazioni dell'esame o la classificazione dei target.

Prestazioni cliniche

Nei casi di UC con alterazione *FGFR*, il trattamento con il farmaco pan-*FGFR* TKI BALVERSA (erdafitinib) ha un tasso di risposta complessivo nel 34,3% dei pazienti mediante Blinded Independent Review Committee (BIRC) (5).

Il *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit è destinato all'uso come test diagnostico, come supporto per identificare i pazienti con casi di tumore uroteliale (Urothelial Cancer, UC) che presentano alterazioni specifiche del gene *FGFR* e che pertanto sono idonei per il trattamento con BALVERSA (erdafitinib).

Correlazione al metodo di riferimento

Per dimostrare l'accuratezza del *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit (relativamente alla digital droplet PCR RT droplet (RT-ddPCR)), è stato condotto uno studio dell'accuratezza con campioni provenienti dalla sperimentazione clinica 42756493-BLC2001, integrati con campioni ottenuti dalla popolazione destinata allo stesso utilizzo (intento diagnostico). Il *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit e il test ddPCR per le alterazioni *FGFR* è stato eseguito sugli stessi campioni estratti da 307 campioni (271 campioni per la sperimentazione clinica e 36 campioni prelevati).

I campioni con risultati validi sia per il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit che per il ddPCR (n = 306) sono stati analizzati per valutare la concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA), la concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA) e la concordanza percentuale complessiva (Overall Percent Agreement, OPA), sulla base di un accordo tra i due metodi per lo stato di alterazione FGFR complessivo (FGFR Alteration Detected (Alterazione FGFR rilevata) o No Alteration Detected (Nessuna alterazione rilevata)). Questi valori percentuali sono riassunti nella Tabella 12 ai corrispondenti intervalli di confidenza (IC) al 95% bilaterali.

Tabella 12. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e ddPCR (con ddPCR come metodo ortogonale)

Misura della concordanza	Concordanza percentuale % (N)	IC al 95% bilaterale
Concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA)	99,04% (103/104)	94,76, 99,98
Concordanza percentuale di negatività (Negative percent agreement, NPA)	97,52% (197/202)	94,32, 99,19
Concordanza percentuale totale (Overall Percent Agreement, OPA)	98,04% (300/306)	95,78, 99,28

Per i sei risultati discordanti complessivi sullo stato di alterazione *FGFR*, un campione restituiva un risultato No Alteration Detected (Nessuna alterazione rilevata) mediante il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e risultati FGFR Alteration Detected (Alterazione FGFR rilevata) mediante ddPCR e cinque campioni restituivano risultati di FGFR Alteration Detected (Alterazione FGFR rilevata) mediante il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e risultati No Alteration Detected (Nessuna alterazione rilevata) mediante ddPCR. La Tabella 13 mostra il PPA dell'alterazione target con il ddPCR come metodo di riferimento.

Tabella 13. PPA con ddPCR come metodo ortogonale, insieme agli intervalli di confidenza al 95% bilaterali mediante per alterazioni

Alterazione	Percentuale di concordanza % (n corretto/n totale)	IC al 95% bilaterale
p.R248C (c.742C>T)	93,33% (14/15)	68,05, 99,83
p.S249C (c.746C>G)	100,00% (56/56)	93,62, 100,00
p.G370C (c.1108G>T)	100,00% (2/2)	15,81, 100,00
p.Y373C (c.1118A>G)	100,00% (18/18)	81,47, 100,00
FGFR3-TACC3v1	100,00% (16/16)	79,41, 100,00
FGFR3-TACC3v3	100,00% (5/5)	47,82, 100,00
FGFR3-BAIAP2L1	100,00% (1/1)	2,50, 100,00

Risultati clinici

Il regime 3 della sperimentazione 42756493-BLC2001 è stato uno studio di fase 2 per determinare l'efficacia e la sicurezza della dose selezionata (8 mg una volta al giorno quotidianamente) di BALVERSA (erdafitinib) nei soggetti con UC metastatico o non operabile chirurgicamente con alterazioni genomiche FGFR. I pazienti idonei dovevano mostrare alterazioni specifiche nei geni FGFR2 o FGFR3 come determinato in modo prospettico dall'esame della sperimentazione clinica (Clinical Trial Assay, CTA). I test retrospettivi sui campioni appartenenti ai pazienti selezionati per la sperimentazione clinica 42756493-BLC2001 sono stati eseguiti con il kit di diagnostica integrativo *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

È stato condotto uno studio comparativo per valutare la concordanza tra i risultati del *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit con il CTA utilizzato per selezionare i pazienti idonei alla sperimentazione clinica 42756493-BLC2001. Lo studio comparativo includeva i campioni di 300 pazienti.

I campioni con risultati validi sia per il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit che per il CTA (n = 292) sono stati analizzati per valutare PPA, NPA e OPA in base alla concordanza tra i due metodi per lo stato di alterazione complessivo del gene *FGFR* (FGFR Alteration Detected (Alterazione FGFR rilevata) o No Alteration Detected (Nessuna alterazione rilevata)). Questi valori percentuali sono riassunti nella Tabella 14, insieme ai corrispondenti IC al 95% bilaterali.

Tabella 14. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e CTA (con CTA come metodo di riferimento)

Misura della concordanza	Concordanza percentuale % (N)	IC al 95% bilaterale
Concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA)	87,2% (82/94)	79,0, 92,5
Concordanza percentuale di negatività (Negative percent agreement, NPA)	97,0% (192/198)	93,5, 98,6
Concordanza percentuale totale (Overall Percent Agreement, OPA)	93,8% (274/292)	90,5, 96,1

Per i 18 risultati discordanti complessivi sullo stato dell'alterazione *FGFR*, 12 campioni hanno restituito un risultato "No Alteration Detected" (Nessuna alterazione rilevata) mediante il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ma hanno restituito risultati "FGFR Alteration Detected" (Alterazione FGFR rilevata) mediante CTA, mentre 6 campioni hanno restituito risultati CTA "FGFR Alteration Detected" (Alterazione FGFR rilevata) mediante il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ma hanno restituito risultati "No Alteration Detected" (Nessuna alterazione rilevata) mediante il CTA. Si noti che nei 94 campioni CTA positivi, 81 sono stati prelevati da pazienti recidivi/refrattari alla chemio. La concordanza positiva in questo gruppo viene mostrata nella Tabella 15.

Tabella 15. Concordanza positiva tra il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit e il CTA (con il CTA come metodo di riferimento); soggetti recidivi/refrattari alla chemio

		CTA FGFR+
Esame QIAGEN	FGFR +	69
	FGFR -	12
	Totale	81
	PPA (IC 95%)	85,2% (75,9-91,3%)

L'obiettivo primario dello studio 42756493-BLC2001 è stato quello di valutare tasso di risposta obiettivo (Objective Response Rate [ORR]) = risposta completa (Complete Response

[CR]) + risposta parziale (Partial Response [PR]) mediante i criteri RECIST come valutati mediante accertamento dei ricercatori. È stato inoltre determinato l'ORR secondo il BIRC. Il vantaggio clinico osservato nel sottoinsieme di pazienti per i quali è stata rilevata un'alterazione FGFR con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (n = 81) è paragonabile a quello osservato nell'intera popolazione dello studio (n = 99). Data l'assenza di dati ORR per le fusioni FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 e FGFR2-CASP7, non è possibile rivendicare la dimostrazione della validità clinica di queste alterazioni. I risultati dell'efficacia complessiva sono illustrati nella Tabella 16.

Tabella 16. Vantaggio clinico per i pazienti sottoposti al test con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit nella popolazione del Regime 3 della sperimentazione clinica 42756493-BLC2001

Parametro	Popolazione <i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit+, n = 81	Popolazione CTA+, n = 99
Tasso di risposta obiettiva (ORR) secondo il BIRC		
Numero di risposte (N)	29	34
ORR, % (IC 95%)	35,8% (26,2-46,7%)	34,3% (25,0-43,7%)
Tasso di risposta obiettiva (ORR) secondo i ricercatori		
Numero di risposte (N)	37	40
ORR, % (IC 95%)	45,7% (35,3-56,5%)	40,4% (30,7-50,1%)

BIRC: Blinded Independent Review Committee; IC: intervallo di confidenza CTA: Clinical Trial Assay.
Kit+: alterazione FGFR rilevata mediante CDx; CTA+: alterazione FGFR rilevata mediante CTA.














Poiché il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit non è stato utilizzato per selezionare i pazienti per la sperimentazione clinica 42756493-BLC2001, sono state condotte ulteriori analisi sull'efficacia per considerare i pazienti non inclusi nella sperimentazione, in quanto il risultato dal test del campione tramite CTA era No Alteration Detected (Nessuna alterazione rilevata), ma ai quali avrebbe potuto essere assegnato un risultato di FGFR Alteration Detected (Alterazione FGFR rilevata) se il campione fosse stato testato con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (vale a dire *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit+/CTA-). Anche i pazienti inclusi nella sperimentazione, ma per i quali non vi sono stati risultati di nuovi test validi con il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sono stati considerati (vale a dire, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit sconosciuti/CTA+). In linea generale, i risultati ottenuti con tutte queste analisi ipotetiche sono stati simili ai risultati ottenuti con l'analisi dell'efficacia primaria.

Bibliografia

1. Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 4, 215.
2. Knowles, M.A. and Hurst, C.D. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat. Rev. Cancer 15, 25.
3. Rodriguez-Vida, A., Saggese, M., Hughes, S., et al. (2015) Complexity of FGFR signaling in metastatic urothelial cancer. J. Hematol. Oncol. 24, 119.
4. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276.
5. BALVERSA (Erdafitinib) Prescribing Information.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Marchio per la Conformità Europea
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Contenuto
	Numero
	Tenere al riparo dalla luce
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura

Simbolo**Definizione del simbolo**



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



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 i distributori locali (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: RT Buffer 1, RT Buffer 2, Miscela Primer RT, Trascrittasi inversa, Controllo positivo, Diluente PC, Miscela di reazione Mutazioni-1, Miscela di reazione Mutazioni-2, Miscela di reazione Fusioni-1, Miscela di reazione Fusioni-2, Acqua per diluente campione, Acqua per NTC	876711
RNeasy DSP FFPE Tissue Kit		
RNeasy DSP FFPE Kit	Per 50 preparazioni di RNA: RNeasy MinElute® Colonnine, Provette di raccolta, Provette di eluizione, Soluzione per la deaffinizzazione, Proteinasi K, DNasi priva di RNasi I, Tampone ausiliario DNasi, Tamponi privi di RNasi e Acqua priva di RNasi.	73604
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRMe accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione (High Resolution Melt) a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori; include 1 anno di garanzia su parti e manodopera; non include installazione e formazione.	9002032

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione (High Resolution Melt) (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori; include 1 anno di garanzia con la copertura di parti e interventi, installazione e formazione.	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni di 20-50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blocco in alluminio per la preparazione manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo in 72 provette da 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Blocco in alluminio per la preparazione manuale delle reazioni con una pipetta a canale singolo in 96 provette per PCR da 0,2 ml.	9018905
72-Well Rotor	Per sostenere Strip Tubes and Caps, 0.1 ml con volumi di reazione di 10-50 µl, è necessario il Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Per bloccare Strip Tubes and Caps, 0.1 ml nel 72-Well Rotor	9018904

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

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, ottobre 2021	Versione iniziale

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Contratto di licenza limitata per il *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit

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

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo pannello e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, vedere www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, MinElute®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, RNeasy®, *therascreen*® (QIAGEN Group); BALVERSA™ (Janssen Research & Development, LLC); TaqMan® (Roche Group). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non possono essere considerati non protetti dalla legge.

1125704 10.21 HB-2952-001 © 2021 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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