

Manuale utente Rotor-Gene[®] Q MDx

IVD

CE

MAT 1081162IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R1

QIAGEN®, EpiTect®, HotStarTaq®, Quantiscript®, QuantiTect®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Type-it® (QIAGEN Group); Adobe®, Illustrator® (Adobe Systems, Inc.); Alexa Fluor®, FAM™, HEX™, JOE™, Marina Blue®, ROX™, SYBR®, SYTO®, TET™, Texas Red®, VIC® (Life Technologies Corporation); CAL Fluor®, Quasar® (Biosearch Technologies, Inc.); Core™, Intel® (Intel Corporation); Cy® (GE Healthcare); EvaGreen® (Biotium, Inc.); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation); LC Green® (Idaho Technology, Inc.); LightCycler® (Roche Group); TeeChart® (Steema Software SL); Yakima Yellow® (Nanogen, Inc.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

For applicable countries:

TeeChartOffice: Copyright 2001-2002 by David Berneda. All rights reserved.

For applicable countries:

This real-time thermal cycler is licensed under pending U.S. Patent rights for an apparatus or system covering automated thermal cyclers with fluorescence detectors and seeking priority to U.S. Serial No. 07/695,201 and corresponding claims in any foreign counterpart patent thereof owned by Applied Biosystems LLC, in all fields, including research and development, all applied fields, and human and animal in-vitro diagnostics. No rights are conveyed expressly, by implication or estoppel to any patents on real-time methods, including but not limited to 5' nuclease assays, or to any patent claiming a reagent or kit. For further information on purchasing additional rights, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

For applicable countries:

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license to one or more of U.S. Patent Nos. 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; 7,273,749; 7,160,998; U.S. Patent Application Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253, and PCT Patent Application No. WO 2007/035806, and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH, and/or Roche Diagnostics GmbH for human or animal in-vitro diagnostics only. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. This product may be operated only with authorized reagents such as fully licensed QIAGEN kits and assays. For information on purchasing licenses for in-vitro diagnostics applications or reagents, please contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. QIAGEN kit handbooks and user manuals are available at www.qiagen.com or can be requested from QIAGEN Technical Services or your local distributors.

© 2005–2014 QIAGEN, all rights reserved.

Contenuto

1	Informazioni di sicurezza	1-1
1.1	Uso corretto	1-2
1.2	Sicurezza elettrica	1-4
1.3	Ambiente	1-5
1.4	Sicurezza biologica	1-5
1.5	Agenti chimici	1-7
1.6	Eliminazione scarti	1-7
1.7	Pericoli meccanici	1-8
1.8	Pericolo termico	1-9
1.9	Manutenzione	1-9
1.10	Simboli sul Rotor-Gene Q MDx	1-10
2	Introduzione	2-1
2.1	Informazioni generali	2-1
2.1.1	Assistenza tecnica	2-1
2.1.2	La nostra politica	2-2
2.1.3	Gestione della versione	2-2
2.2	Uso previsto del Rotor-Gene Q MDx	2-2
3	Descrizione generale	3-3
3.1	Performance termica	3-3
3.2	Sistema ottico	3-5
4	Procedure di installazione	4-1
4.1	Requisiti del sito d'installazione	4-1
4.2	Collegamento all'alimentazione AC	4-2
4.3	Requisiti del PC	4-2

4.4	Disimballaggio del Rotor-Gene Q MDx	4-3
4.5	Accessori	4-4
4.6	Installazione dell'hardware	4-4
4.7	Installazione del software	4-6
4.8	Versione software	4-10
4.9	Software aggiuntivi su computer collegati al Rotor-Gene Q4-11	
4.9.1	Programmi antivirus	4-11
4.9.2	Strumenti di sistema	4-12
4.9.3	Aggiornamenti del sistema operativo	4-12
4.10	Aggiornamento del software	4-12
5	Procedure di funzionamento — Hardware	5-1
5.1	Tipi di rotore	5-1
5.2	Setup della reazione	5-4
5.3	Preparazione del Rotor-Disc	5-9
6	Procedure di funzionamento — Software	6-1
6.1	Procedura guidata "Quick Start"	6-1
6.1.1	Selezione del rotore	6-4
6.1.2	Conferma del profilo	6-5
6.1.3	Salvataggio del processo	6-6
6.1.4	Preparazione del campione	6-7
6.2	Procedura guidata "Advanced"	6-7
6.2.1	Finestra "New Run Wizard" 1	6-9
6.2.2	Finestra "New Run Wizard" 2	6-10
6.2.3	Finestra "New Run Wizard" 3	6-11
6.2.4	"Edit Profile"	6-12
6.2.5	Finestra "New Run Wizard" 4	6-32
6.2.6	Finestra "New Run Wizard" 5	6-32
7	Interfaccia utente analisi	7-1

7.1	Spazio di lavoro	7-1
7.2	Barra degli strumenti	7-1
7.3	Visualizza canali dati grezzi	7-1
7.4	Passaggio da un campione all'altro	7-3
7.5	Menu file	7-6
7.5.1	“New”	7-6
7.5.2	“Open” e “Save”	7-8
7.5.3	Report	7-11
7.5.4	Setup	7-11
7.6	Menu analisi	7-13
7.6.1	Analisi	7-13
7.6.2	Quantificazione	7-15
7.6.3	Curva a due standard	7-36
7.6.4	Quantificazione relativa delta delta C _T	7-42
7.6.5	Analisi della curva di fusione	7-46
7.6.6	Quantificazione comparativa	7-51
7.6.7	Discriminazione allelica	7-54
7.6.8	Analisi Scatter graph	7-56
7.6.9	Analisi EndPoint	7-60
7.6.10	Analisi della concentrazione	7-68
7.6.11	Analisi di fusione ad alta risoluzione	7-71
7.7	Menu di processo	7-73
7.7.1	“Start Run”	7-73
7.7.2	Processo in pausa	7-73
7.7.3	Arresta processo	7-73
7.8	Menu di visualizzazione	7-74
7.8.1	“Run Settings”	7-74
7.8.2	Grafico temperatura	7-78
7.8.3	Progresso del profilo	7-79
7.8.4	Modifica campioni	7-80
7.8.5	Visualizzazione opzioni	7-90
7.9	Menu sicurezza	7-91
7.9.1	Configurazione di Windows XP Security	7-92

7.9.2	Configurazione per Windows 7	7-103
7.9.3	Gestione di più utenti sullo stesso computer	7-111
7.9.4	“Audit trail”	7-112
7.9.5	Firme dei processi	7-113
7.9.6	Bloccaggio campioni	7-115
7.9.7	Modelli bloccati	7-117
7.10	Menu “Gain”	7-118
7.11	Menu “Window”	7-119
7.12	Funzione “Help”	7-119
7.12.1	Invio e-mail per supporto	7-120
8	Funzioni aggiuntive	8-1
8.1	Modelli di analisi	8-1
8.2	Apertura di un secondo processo	8-1
8.3	Opzioni di scala	8-1
8.4	Esportazione di grafici	8-2
8.5	Icona chiave inglese	8-6
8.6	Opzioni dell'area selezionata	8-7
9	Procedure di manutenzione	9-1
10	Verifica ottica temperatura	10-1
10.1	Principio OTV	10-1
10.2	Componenti del kit Rotor-Disc OTV	10-2
10.3	Esecuzione di un OTV	10-2
11	Analisi di fusione ad alta risoluzione	11-1
11.1	Strumentazione	11-3
11.2	Sostanze chimiche	11-3
11.3	Esempio di genotipizzazione di SNP	11-4

11.4	Esempio di analisi della metilazione	11-6
11.5	Linee guida per la riuscita dell'analisi HRM	11-7
11.6	Preparazione del campione	11-10
11.7	Preparazione del software	11-10
11.8	Analisi dati PCR in tempo reale	11-20
11.9	Analisi dei dati HRM	11-21
12	Risoluzione dei problemi	12-1
12.1	Log Archives	12-1
12.2	Risoluzione problemi in HRM	12-1
12.3	Errori generali dello strumento	12-3
12.4	Messaggi di Rotor-Gene Q Software	12-11
13	Glossario	1
	Appendice A	A-1
	Dati tecnici	A-1
	Condizioni ambientali	A-1
	Dichiarazione FCC	A-4
	Dichiarazione di conformità	A-6
	Direttiva sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici (WEEE)	A-7
	Appendice B	B-1
	Quantificazione	B-1
	Appendice C	C-1
	Prodotti, accessori e prodotti di consumo Rotor-Gene Q MDx	C-1
	Appendice D	D-1
	Clausola di responsabilità limitata	D-1


Indice analitico


Indice analitico-1

1 Informazioni di sicurezza

Prima di utilizzare il Rotor-Gene Q MDx, è fondamentale leggere attentamente il presente manuale di istruzioni, prestando particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza. Le istruzioni e le informazioni sulla sicurezza nel manuale utente devono essere rispettate per garantire il funzionamento sicuro dello strumento e per mantenere lo stesso in condizioni di sicurezza.


Il presente manuale contiene le seguenti informazioni sulla sicurezza.


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Il termine AVVERTENZA segnala situazioni che possono avere come conseguenza lesioni personali per l'utente o per terzi.</p> <p>I dettagli su queste circostanze sono segnalati in un riquadro come quello raffigurato.</p>
--	--


<p>ATTENZIONE</p> 	<p>Il termine ATTENZIONE segnala situazioni che potrebbero determinare un danno allo strumento o ad altre apparecchiature.</p> <p>I dettagli su queste circostanze sono segnalati in un riquadro come quello raffigurato.</p>
--	--


Le linee guida fornite nel presente manuale sono volte ad aggiungersi, e non a sostituire, i normali requisiti di sicurezza in vigore nel paese dell'utente.

1.1 Uso corretto






AVVERTENZA/ ATTENZIONE 	Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W1] L'uso improprio del Rotor-Gene Q MDx può causare lesioni personali o danni allo strumento. Il Rotor-Gene Q MDx deve essere azionato unicamente da personale qualificato, che sia stato adeguatamente formato. La manutenzione del Rotor-Gene Q MDx deve essere effettuata esclusivamente da tecnici dell'assistenza in loco QIAGEN.
--	--


AVVERTENZA/ ATTENZIONE 	Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W2] Il Rotor-Gene Q MDx è uno strumento pesante. Per evitare il rischio di lesioni personali o danni allo strumento, sollevare lo strumento con cautela.
--	---

AVVERTENZA/ ATTENZIONE 	Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W3] Non tentare di spostare Rotor-Gene Q MDx mentre è in funzione.
--	---

ATTENZIONE 	Danni allo strumento [C1] Evitare di versare acqua o prodotti chimici sul Rotor-Gene Q MDx. I danni causati da acqua o prodotti chimici annullano la garanzia.
--	---

Nota: In caso d'emergenza, spegnere il Rotor-Gene Q MDx mediante l'interruttore generale sul retro dello strumento ed estrarre il cavo di alimentazione dalla presa.


<p>AVVERTENZA/ ATTENZIONE</p> 	<p>Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W4]</p> <p>Non tentare di aprire il coperchio durante un esperimento o mentre il Rotor-Gene Q MDx è in rotazione. In caso contrario, se si forza la serratura del coperchio e si accede all'interno, si rischia di toccare parti ad alta temperatura, sotto tensione o in moto ad alta velocità, con pericolo di lesioni personali e danni allo strumento.</p>
<p>AVVERTENZA/ ATTENZIONE</p> 	<p>Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W5]</p> <p>Se si vuole interrompere rapidamente un esperimento, spegnere lo strumento, poi aprire il coperchio. Lasciar raffreddare la camera prima di accedervi. In caso contrario si rischia di toccare parti a temperatura elevata.</p>
<p>AVVERTENZA/ ATTENZIONE</p> 	<p>Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W6]</p> <p>Usando lo strumento in modo non specificato dal produttore, si può compromettere la protezione prevista dallo strumento stesso.</p>
<p>AVVERTENZA/ ATTENZIONE</p> 	<p>Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W7]</p> <p>Non lasciare fogli di carta sotto il Rotor-Gene Q MDx perchè interferiscono con il suo raffreddamento. Si raccomanda di lasciare perfettamente sgombra l'area sotto lo strumento.</p>
<p>ATTENZIONE</p> 	<p>Danni allo strumento [C2]</p> <p>Usare sempre un anello di bloccaggio sul rotore. In questo modo si evita che durante l'esperimento i tappi escano dalle provette. I tappi che escono dalle provette durante l'esperimento possono danneggiare la camera.</p>

ATTENZIONE 	Danni allo strumento [C3] Ispezionare visivamente il rotore e verificare che non sia danneggiato o deformato prima di ogni processo.
--	---

Non toccare il Rotor-Gene Q MDx durante un esperimento se si è carichi di elettricità statica. Nei casi più gravi il Rotor-Gene Q MDx può resettarsi. Il software tuttavia riavvia il Rotor-Gene Q MDx e continua l'esperimento.

1.2 Sicurezza elettrica

Scollegare il cavo di alimentazione dalla presa prima di effettuare gli interventi di assistenza.

AVVERTENZA 	Rischio elettrico [W8] Eventuali interruzioni del conduttore di protezione (conduttore di terra/massa) all'interno o all'esterno dello strumento o la disconnessione del morsetto del conduttore di protezione potrebbero rendere pericoloso lo strumento. È vietato procurare l'interruzione intenzionale. Tensioni letali all'interno dello strumento Quando lo strumento è connesso alla linea di alimentazione, i morsetti potrebbero essere sotto tensione e l'apertura delle coperture o la rimozione di componenti potrebbero esporre parti sotto tensione.
--	---


Per garantire il funzionamento soddisfacente e in sicurezza del Rotor-Gene Q MDx, seguire le raccomandazioni seguenti:

- Il cavo di alimentazione deve essere connesso ad una presa di alimentazione di rete dotata di conduttore di protezione (terra/massa).
- È vietato regolare o sostituire parti interne dello strumento.
- Non mettere in funzione lo strumento dopo aver rimosso coperture o componenti.
- In caso di penetrazione di liquidi nello strumento, spegnerlo e scollegarlo dalla presa di alimentazione,

quindi contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.


Se la sicurezza elettrica dello strumento è stata compromessa, impedire ad altre persone di usarlo e contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN. La sicurezza elettrica dello strumento è compromessa quando:


- Lo strumento stesso o il cavo di alimentazione appaiono danneggiati.
- Lo strumento è stato conservato in condizioni inappropriate per un periodo prolungato.
- Lo strumento è stato trasportato in condizioni difficili.

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Rischio elettrico [W9]</p> <p>Lo strumento è dotato di un'etichetta di conformità elettrica che indica la tensione e la frequenza dell'alimentazione e i dati del o dei fusibili. L'apparecchiatura deve essere messa in funzione solo a queste condizioni.</p>
--	--

1.3 Ambiente

Condizioni di funzionamento

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Atmosfera esplosiva [W10]</p> <p>Il Rotor-Gene Q MDx non è destinato all'uso in atmosfera esplosiva.</p>
--	---

<p>ATTENZIONE</p> 	<p>Danni allo strumento [C4]</p> <p>La luce solare diretta può scolorire le parti esposte dello strumento e danneggiare gli elementi in plastica. Il Rotor-Gene Q MDx deve essere collocato in luogo non esposto alla luce solare diretta.</p>
--	--


1.4 Sicurezza biologica

Campioni e reagenti contenenti materiali di origine biologica devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Adottare

procedure di laboratorio sicure del tipo descritto in pubblicazioni quali *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, HHS (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm).

Campioni

I campioni possono contenere agenti infettivi. Tenere presente il rischio sanitario presentato da questi agenti e usare, conservare ed eliminare i campioni in conformità con le norme sanitarie del caso.


AVVERTENZA	Campioni contenenti agenti infettivi [W11]
	<p>Alcuni campioni usati con questo strumento possono contenere agenti infettivi. Manipolare tali campioni con la massima cura e nel rispetto delle norme di sicurezza applicabili.</p> <p>Indossare sempre occhiali protettivi, 2 paia di guanti e un camice da laboratorio.</p> <p>L'organo responsabile (per es. il responsabile di laboratorio) deve prendere tutte le precauzioni necessarie per garantire che il luogo di lavoro sia sicuro e che gli operatori abbiano ricevuto un addestramento adeguato e non siano esposti a livelli pericolosi di agenti infettivi, secondo la definizione delle schede tecniche di sicurezza (SDS) o dei documenti OSHA,* ACGIH,† o COSHH‡.</p> <p>Lo sfianto dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutte le normative e leggi sanitarie e antinfortunistiche vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Stati Uniti d'America).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Stati Uniti d'America).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Regno Unito).

1.5 Agenti chimici

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Agenti chimici pericolosi [W12]</p> <p>Alcuni agenti chimici utilizzati con lo strumento possono essere pericolosi o diventarlo al termine del protocollo. Indossare sempre occhiali protettivi, guanti e un camice da laboratorio.</p> <p>L'organo responsabile (per es. il responsabile di laboratorio) deve prendere tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), secondo la definizione delle schede tecniche di sicurezza (SDS) o dei documenti OSHA,* ACGIH,[†] o COSHH[‡].</p> <p>Lo sfianto dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutte le normative e leggi sanitarie e antinfortunistiche vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	--

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Stati Uniti d'America).

[†] ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Stati Uniti d'America).

[‡] COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Regno Unito).

Fumi tossici


Quando si lavora con solventi o sostanze tossiche volatili, si deve prevedere un sistema efficiente di ventilazione del laboratorio per eliminare i vapori eventualmente prodotti.


1.6 Eliminazione scarti


I prodotti di consumo e le materie plastiche utilizzati possono contenere prodotti chimici pericolosi o agenti infettivi. Tali scarti devono essere raccolti ed eliminati correttamente secondo le norme locali relative.


1.7 Pericoli meccanici


Il coperchio del Rotor-Gene Q MDx deve rimanere chiuso mentre lo strumento è in funzione.


AVVERTENZA	Parti in movimento [W13]
	Per evitare il contatto con parti in movimento mentre il Rotor-Gene Q MDx è in funzione, lo strumento deve essere azionato con il coperchio chiuso.

AVVERTENZA/ ATTENZIONE	Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W14]
	Aprire e chiudere con cautela il coperchio del Rotor-Gene Q MDx per evitare che le dita o il vestiario vi restino intrappolati.


ATTENZIONE	Danni allo strumento [C5]
	Accertarsi che il rotore e l'anello di bloccaggio siano installati correttamente. Se il rotore o l'anello di bloccaggio mostrano segni di danno meccanico o corrosione, non utilizzare il Rotor-Gene Q MDx e contattare invece il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.


ATTENZIONE	Danni allo strumento [C6]
	Avviando il Rotor-Gene Q MDx immediatamente dopo la consegna in un clima freddo, le parti meccaniche potrebbero bloccarsi. Attendere almeno un'ora affinché lo strumento si porti a temperatura ambiente prima di accenderlo.

AVVERTENZA	Parti in movimento [W15]
	In caso di arresto causato da mancanza di corrente, rimuovere il cavo di alimentazione e attendere 10 minuti prima di cercare di aprire manualmente il coperchio.

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Rischio di surriscaldamento [W16]</p> <p>Per garantire la ventilazione corretta, mantenere una distanza minima di 10 cm ai lati e sul retro del Rotor-Gene Q MDx.</p> <p>Le fessure e le aperture che garantiscono la ventilazione del Rotor-Gene Q MDx non devono essere coperte.</p>
--	---


1.8 Pericolo termico


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Superficie calda [W17]</p> <p>La camera del Rotor-Gene Q MDx può raggiungere temperature superiori a 120°C. Evitare di toccarla mentre è calda.</p>
--	--

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Superficie calda [W18]</p> <p>Quando si mette in pausa un processo, il Rotor-Gene Q MDx non si raffredda completamente fino alla temperatura ambiente. Usare cautela se si maneggiano il rotore o le provette nello strumento.</p>
--	---


1.9 Manutenzione

Eeguire la manutenzione secondo quanto previsto alla Sezione 9. QIAGEN addebita all'utente le riparazioni richieste in seguito ad errata manutenzione.

<p>AVVERTENZA/ ATTENZIONE</p> 	<p>Rischio di lesioni personali e danni all'apparecchiatura [W19]</p> <p>Eeguire solo la manutenzione richiesta esplicitamente nel presente manuale.</p>
--	--







AVVERTENZA 	<p>Rischio di incendio [W20]</p> <p>Se si pulisce il Rotor-Gene Q MDx con disinfettante a base di alcol, lasciare aperto il coperchio del Rotor-Gene Q MDx per permettere la dispersione dei vapori infiammabili.</p> <p>Pulire il Rotor-Gene Q MDx solo dopo che la camera si è raffreddata.</p>
--	---

AVVERTENZA/ ATTENZIONE 	<p>Pericolo di folgorazione [W21]</p> <p>Non smontare il Rotor-Gene Q MDx.</p>
--	--

ATTENZIONE 	<p>Danni alla carcassa dello strumento [C7]</p> <p>Non pulire mai la carcassa dello strumento con alcol o soluzioni alcoliche. L'alcol danneggia la carcassa. Per pulire la carcassa, usare unicamente acqua distillata.</p>
--	--

1.10 Simboli sul Rotor-Gene Q MDx

Simbolo	Posizione	Descrizione
	Vicino alla camera campioni, visibile quando il coperchio è aperto	Pericolo termico - la temperatura nella camera può superare i 120°C
	Retro dello strumento	Consultare le istruzioni per l'uso
	Targhetta identificativa sul retro dello strumento	Marchio CE per la Conformità Europea
	Targhetta identificativa sul retro dello strumento	Dispositivo medico per diagnostica in vitro

Simbolo	Posizione	Descrizione
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Marchio CSA per il Canada e gli USA</p>
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Produttore autorizzato</p>
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Marchio WEEE per l'Europa</p>
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Marchio FCC della Federal Communications Commission degli Stati Uniti</p>
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Marchio C-Tick per l'Australia (Identificazione fornitore N17965)</p>
	<p>Targhetta identificativa sul retro dello strumento</p>	<p>Marchio RoHS per la Cina (limitazione all'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche)</p>

2 Introduzione

Grazie per aver scelto lo strumento Rotor-Gene Q MDx. Siamo fiduciosi che diventerà parte integrante del vostro laboratorio.

Prima di utilizzare il Rotor-Gene Q MDx, è fondamentale leggere attentamente il presente manuale di istruzioni, prestando particolare attenzione alle informazioni sulla sicurezza. Le istruzioni e le informazioni sulla sicurezza nel manuale utente devono essere rispettate per garantire il funzionamento sicuro dello strumento e per mantenere lo stesso in condizioni di sicurezza.

2.1 Informazioni generali

2.1.1 Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio supporto tecnico. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da scienziati esperti che hanno alle spalle una lunga esperienza maturata a livello pratico e teorico nella biologia molecolare e nell'impiego dei prodotti QIAGEN. In caso vogliate porre domande o incontriate difficoltà con gli strumenti Rotor-Gene Q MDx o con i prodotti QIAGEN in generale, vi preghiamo di non esitare a contattarci.

I clienti QIAGEN sono una fonte importante d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri scienziati che ai ricercatori della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a comunicarci i vostri eventuali suggerimenti sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche.

Per ottenere assistenza tecnica e altre informazioni, rivolgersi ad uno dei reparti di assistenza tecnica QIAGEN o ai distributori locali (vedere retro di copertina).

Per informazioni aggiornate su Rotor-Gene Q MDx, visitare www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx.

2.1.2 La nostra politica

La politica di QIAGEN è quella di ottimizzare i propri prodotti non appena si rendono disponibili tecniche e componenti nuovi. QIAGEN si riserva il diritto di modificare le specifiche in qualsiasi momento.

Nell'intento di produrre una documentazione utile e appropriata, saremo lieti di ricevere i vostri commenti sul presente manuale utente. Vogliate contattare a questo scopo l'assistenza tecnica QIAGEN.

2.1.3 Gestione della versione

Il presente documento è il *Manuale utente Rotor-Gene Q MDx*, versione 2.0, revisione R1 per strumenti Rotor-Gene Q MDx che utilizzano il software Rotor-Gene Q a partire dalla versione 2.3.1.

2.2 Uso previsto del Rotor-Gene Q MDx

Lo strumento Rotor-Gene Q MDx è progettato per operazioni in tempo reale di termociclatura, individuazione e/o quantificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) nelle applicazioni cliniche.

Il Rotor-Gene Q MDx è destinato ad essere utilizzato unicamente in combinazione con i kit QIAGEN indicati per l'utilizzo con strumenti Rotor-Gene Q per le applicazioni descritte nei manuali dei rispettivi kit QIAGEN.

Se si utilizza lo strumento Rotor-Gene Q MDx con kit diversi dai kit QIAGEN, è responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni di tale combinazione di prodotti per un determinato tipo di applicazione.

Il Rotor-Gene Q MDx è destinato all'uso diagnostico in vitro.

Il Rotor-Gene Q MDx è rivolto ad utenti professionisti, quali tecnici e medici che conoscono le tecniche di biologia molecolare e il funzionamento dello strumento Rotor-Gene Q MDx.

3 Descrizione generale

Il Rotor-Gene Q MDx è uno strumento innovativo che consente di eseguire PCR di alta precisione in tempo reale e che è ideale per applicazione diagnostiche in vitro in combinazione con i kit QIAGEN con contrassegno IVD.

Il software, potente e di utilizzo intuitivo, si presenta semplice per i principianti, ma offre al tempo stesso una piattaforma sperimentale aperta per gli utenti esperti.

Feritoie di ventilazione

Impugnatura coperchio

Camera rotore

Spie di stato dello strumento



3.1 Performance termica

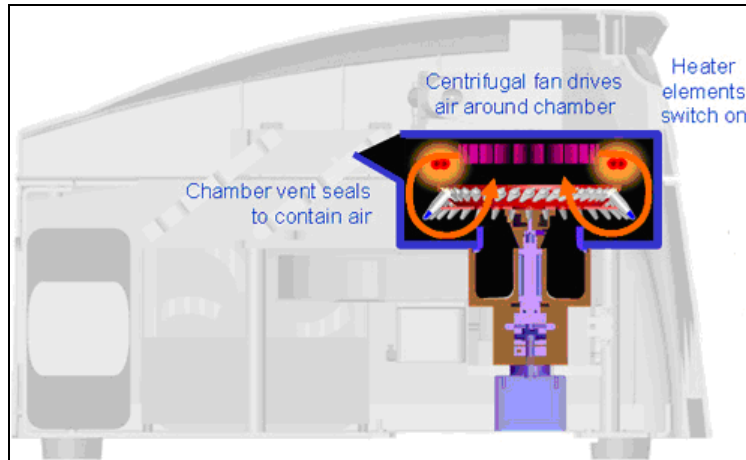
Il Rotor-Gene Q MDx utilizza un sofisticato sistema di riscaldamento e raffreddamento per ottenere condizioni di reazione ottimali. L'esclusivo formato rotatorio garantisce uniformità termica e ottica tra i campioni, determinante per precisione e affidabilità dell'analisi.

Durante un processo i campioni ruotano continuamente a 400 giri/min. La centrifugazione impedisce la condensazione ed elimina le bolle d'aria, ma non sedimenta il DNA. Inoltre, non occorre centrifugare i campioni prima di un processo.

I campioni sono riscaldati e raffreddati in un forno ad aria a bassa massa termica. Si ottiene il riscaldamento grazie ad un elemento al nichel-cromo nel coperchio. La camera viene

raffreddata facendo uscire l'aria dalla parte alta della camera mentre si aspira l'aria ambiente attraverso la base.

Riscaldamento



Raffreddamento

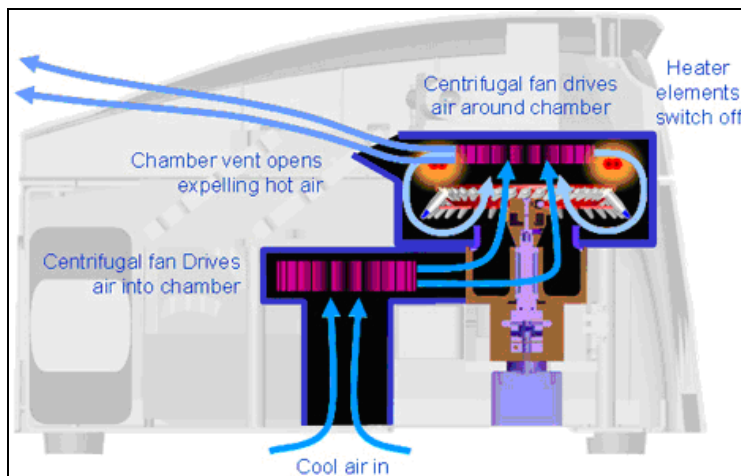


Illustrazione del sistema di riscaldamento e raffreddamento

3.2 Sistema ottico

Con una scelta di 6 fonti di eccitazione e 6 filtri di rilevamento combinati con un breve percorso ottico fisso, il Rotor-Gene Q MDx può essere usato per reazioni multiple, garantendo una minima variabilità di fluorescenza tra i campioni ed eliminando la necessità di taratura o compensazione.

I campioni sono eccitati dal fondo della camera da un LED. L'energia è trasmessa attraverso le sottili pareti alla base della provetta. La fluorescenza emessa passa attraverso filtri d'emissione sul lato della camera e viene poi catturata da un fotomoltiplicatore. Il percorso ottico fisso garantisce un'eccitazione uniforme per ogni campione, ossia non occorre usare un colorante interno passivo di riferimento quale il ROX™.

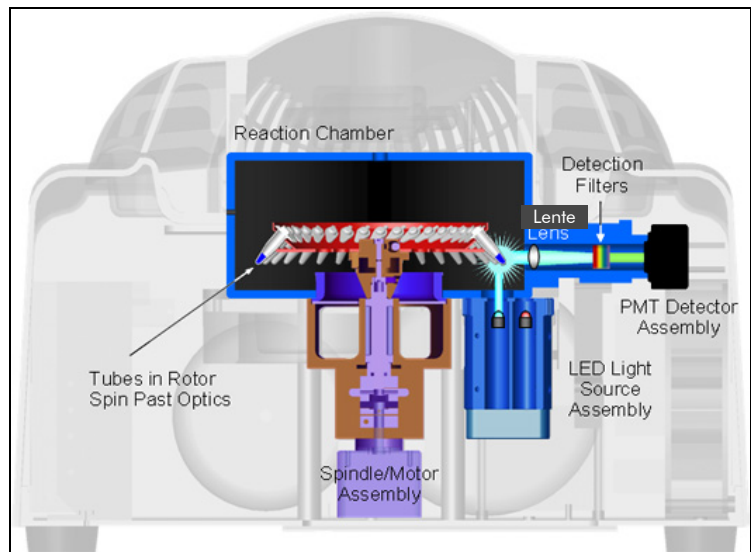


Illustrazione del sistema ottico

Canali disponibili

Canale	Eccitazione (nm)	Rilevamento (nm)	Esempi di fluorofori rilevati
Blue	365±20	460±20	Marina Blue [®] , Edans Bothell Blue, Alexa Fluor [®] 350, AMCA-X, ATTO 390
Green	470±10	510±5	FAM [®] , SYBR [®] Green I, Fluorescein, EvaGreen [®] , Alexa Fluor 488
Yellow	530±5	557±5	JOE [™] , VIC [®] , HEX [™] , TET [™] , CAL Fluor [®] Gold 540, Yakima Yellow [®]
Orange	585±5	610±5	ROX, CAL Fluor Red 610, Cy [®] 3.5, Texas Red [®] , Alexa Fluor 568
Red	625±10	660±10	Cy5, Quasar [®] 670, LightCycler [®] Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680±5	712 pass-alto	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Analisi di fusione ad alta risoluzione (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO [®] 9, LC Green [®] , LC Green Plus+, EvaGreen

Nota: I kit QIAGEN indicati per l'uso con gli strumenti Rotor-Gene Q MDx sono ottimizzati per certe combinazioni di coloranti. Per maggiori informazioni, consultare i manuali dei kit corrispondenti.

4 Procedure di installazione


4.1 Requisiti del sito d'installazione


Gli strumenti Rotor-Gene Q MDx devono essere posizionati al riparo dalla luce solare diretta, lontano da fonti di calore e da fonti di vibrazioni e interferenze elettriche. Fare riferimento all'Appendice A per le condizioni di funzionamento (temperatura e umidità). Il sito d'installazione non deve essere esposto ad eccesso di correnti d'aria, umidità o polvere, né a notevoli escursioni termiche.

Fare riferimento all'Appendice A per il peso e le dimensioni degli strumenti Rotor-Gene Q MDx. Verificare che il banco di lavoro sia asciutto, pulito e dotato di spazio supplementare per gli accessori. Per ulteriori informazioni sulle specifiche necessarie del banco di lavoro, contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN.

Nota: È estremamente importante che il Rotor-Gene Q MDx sia collocato su una superficie stabile, piana ed esente da vibrazioni. Per le condizioni di funzionamento, vedere l'Appendice A.

Il Rotor-Gene Q MDx deve essere collocato a una distanza di 1,5 m circa da una presa di alimentazione AC dotata di corretta messa a terra (massa).

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Atmosfera esplosiva [W10]</p> <p>Il Rotor-Gene Q MDx non è destinato all'uso in atmosfera esplosiva.</p>
--	---

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Rischio di surriscaldamento [W16]</p> <p>Per garantire la ventilazione corretta, mantenere una distanza minima di 10 cm ai lati e sul retro del Rotor-Gene Q MDx.</p> <p>Le fessure e le aperture che garantiscono la ventilazione del Rotor-Gene Q MDx non devono essere coperte.</p>
--	---

4.2 Collegamento all'alimentazione AC

Requisiti di alimentazione

Il Rotor-Gene Q MDx funziona a:

- 100–240 V AC a 50–60Hz, 520 VA (picco)

Verificare che la tensione nominale di Rotor-Gene Q MDx sia compatibile con la tensione in AC disponibile presso il sito di installazione. Le fluttuazioni della tensione di rete non devono essere superiori al 10% delle tensioni di alimentazione nominali.

Requisiti di messa a terra

Per proteggere il personale addetto, QIAGEN raccomanda la corretta messa a terra (collegamento a massa) del Rotor-Gene Q MDx. Lo strumento è dotato di un cavo di alimentazione AC a 3 conduttori che, se collegato ad una presa AC adeguata, collega a terra lo strumento. Per tutelare questa funzione di protezione, non collegare lo strumento a prese di alimentazione in AC che non siano dotate di messa a terra (collegamento a massa).

Installazione del cavo di alimentazione AC

Collegare un'estremità del cavo di alimentazione AC alla presa sul retro del Rotor-Gene Q MDx, e l'altra estremità alla presa di alimentazione AC.

4.3 Requisiti del PC

Il portatile fornito come optional con il Rotor-Gene Q MDx risponde ai requisiti del software Rotor-Gene Q, riportati nella tabella seguente.

Requisiti del sistema PC

Descrizione	Requisiti minimi
Sistema operativo	Microsoft® Windows® XP Professional edition (32 bit); Microsoft Windows 7 Professional edition (32 bit o 64 bit)*
Processore	Intel® Core™ 2 Duo T5500 1,66GHz o superiore
Memoria principale	1 GB RAM
Spazio su disco fisso	10 GB HDD
Grafica	Adattatore e schermo da almeno 1200 x 800 pixel
Interfaccia	Porta seriale RS-232 o porta USB

* Per l'esecuzione del software Rotor-Gene Q con funzioni di sicurezza è necessario installare Microsoft Windows XP o Windows 7 Professional edition (vedere la sezione 7.9). Le funzioni di sicurezza non sono disponibili se si utilizza la Windows XP o Windows 7 Home edition.

4.4 Disimballaggio del Rotor-Gene Q MDx

Il Rotor-Gene Q MDx viene consegnato completo di tutti i componenti occorrenti per il setup e il funzionamento dello strumento. La scatola contiene anche un elenco di tutti i componenti forniti.

Nota: Controllare le voci di questa lista per accertarsi che siano presenti tutti i componenti.

Nota: Prima dell'installazione, controllare che lo strumento e gli accessori forniti non abbiano subito danni durante il trasporto.

La scatola degli accessori è posta sopra l'imballo in espanso. La scatola accessori contiene:

- Guida per l'installazione (in inglese, traduzioni disponibili sul CD con i manuali)
- CD (software)
- CD (manuali)
- Blocco di caricamento da 96 provette da 0,2 ml
- Blocco di caricamento da 72 provette da 0,1 ml
- Portarotore (smontato per sicurezza durante il trasporto)
- Rotore a 36 pozzetti (questo rotore è di colore rosso)
- Anello di bloccaggio per rotore a 36 pozzetti
I seguenti articoli sono imballati su ciascun lato dell'imballo in espanso:
 - Cavo seriale USB e RS-232
 - Set di cavi di alimentazione internazionali
 - Provette PCR, 0,2 ml (1000)
 - Provette per strisce e tappi, 0,1 ml (1000)

Una volta rimossi questi componenti dalla scatola, rimuovere l'imballo in espanso sopra il Rotor-Gene Q MDx. Con cautela, rimuovere il Rotor-Gene Q MDx dalla scatola e togliere l'involucro in plastica. Spingere indietro il coperchio per accedere alla camera di reazione.

I seguenti articoli sono già installati all'interno del Rotor-Gene Q MDx:

- Rotore a 72 pozzetti (questo rotore è di colore blu)
- Anello di bloccaggio per rotore a 72 pozzetti


La confezione può includere anche un computer portatile (notebook), a seconda dell'ordinazione effettuata.

4.5 Accessori

I Rotor-Disc e gli accessori possono essere ordinati separatamente per l'uso su Rotor-Gene Q MDx. Per maggiori dettagli, vedere l'Appendice C.

4.6 Installazione dell'hardware

Una volta disimballato il Rotor-Gene Q MDx, procedere con l'installazione come descritto di seguito.

ATTENZIONE 	Danni allo strumento [C6] Avviando il Rotor-Gene Q MDx immediatamente dopo la consegna in un clima freddo, le parti meccaniche potrebbero bloccarsi. Attendere almeno un'ora affinché lo strumento si porti a temperatura ambiente prima di accenderlo.
--	--

Procedere come segue:

1. Collocare il Rotor-Gene Q MDx su una superficie piana.
2. Verificare che lo spazio dietro lo strumento sia sufficiente ad aprire completamente il coperchio.
3. Verificare che l'interruttore generale sul retro dello strumento sia facilmente raggiungibile.
4. Non ostruire il retro dello strumento. Verificare che il cavo di alimentazione possa essere facilmente staccato se necessario per togliere corrente allo strumento.
5. Collegare il cavo USB o il cavo seriale RS-232 in dotazione alla porta USB o alla porta di comunicazione sul retro del computer.
6. Collegare il cavo USB o il cavo seriale RS-232 al retro del Rotor-Gene Q MDx.
7. Quindi collegare il Rotor-Gene Q MDx all'alimentazione elettrica. Collegare un'estremità del cavo di alimentazione AC alla presa sul retro del Rotor-Gene Q MDx, e l'altra estremità alla presa di alimentazione AC.

Interruttore di accensione/ spegnimento

Presca di alimentazione

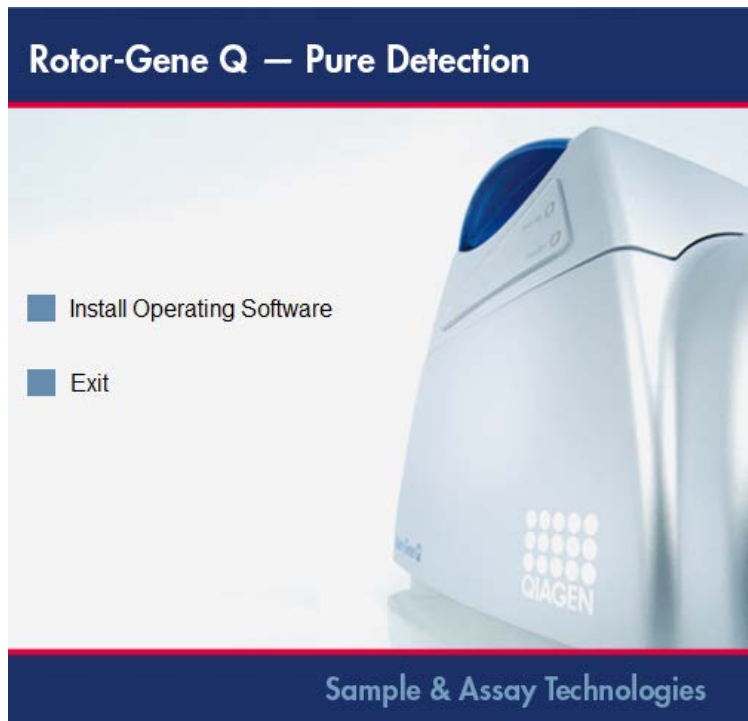


Nota: Collegare il Rotor-Gene Q MDx al computer esclusivamente con i cavi USB e seriali forniti in dotazione con lo strumento. Non usare altri cavi.

4.7 Installazione del software

1. Per installare il software Rotor-Gene Q, inserire il CD (software) fornito con lo strumento nel lettore CD del computer.
2. Selezionare "Install Operating Software" (Installare software operativo) nella finestra che si apre.

Nota: Consultare la *Guida per l'installazione di Rotor-Gene Q* fornita con lo strumento per semplificare l'installazione e come guida attraverso tutte le fasi successive dell'installazione del software.



3. Una volta installato il software, sul desktop sarà creata automaticamente un'icona.
4. Accendere il Rotor-Gene Q MDx portando su "I" l'interruttore sul lato sinistro dietro lo strumento. Una spia blu di "Standby" sul lato anteriore del Rotor-Gene Q MDx indica che lo strumento è pronto per l'uso.
Nota: Quando si avvia il collegamento a un computer per la prima volta, il Rotor-Gene Q MDx sarà riconosciuto dal sistema operativo e comparirà una serie di messaggi. : Consultare la *Guida per l'installazione di Rotor-Gene Q* fornita con lo strumento (CD e edizione stampata).



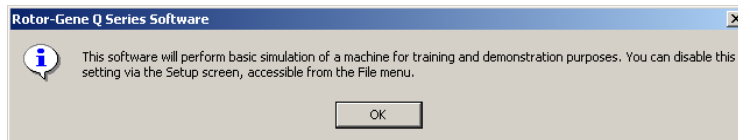
5. Fare doppio clic sull'icona "Rotor-Gene Q Series software" (Software Serie Rotor-Gene Q) sul desktop per lanciare il software.



6. La prima volta che si lancia il software, si apre una finestra "Welcome" (Benvenuto), che non comparirà più nei successivi aggiornamenti del software.



- “Machine Serial Number” (Numero di matricola della macchina): Immettere con la tastiera il numero di matricola (7 cifre) riportato sul retro del Rotor-Gene Q MDx.
- “Port”:
Scegliere tra cavo USB o seriale. Selezionare la porta di comunicazione appropriata o cliccare sul pulsante “Auto-Detect” (Rilevamento automatico).
- “Auto-Detect”:
Se si utilizza questa opzione, la corrispondente porta USB o seriale sarà individuata automaticamente e visualizzata nell'elenco a discesa “Port”.
- “Run in Virtual Mode (for demonstration)” (Processo in modo virtuale (a scopo dimostrativo)):
Selezionando questa casella si consente l'installazione del software Rotor-Gene Q MDx su un computer non collegato a un Rotor-Gene Q MDx. Il software è completamente funzionale e in grado di simulare un processo.
Nota: Se si seleziona questa casella con un Rotor-Gene Q MDx collegato al computer, prima che inizi il processo compare il seguente messaggio: “You are about to run in Virtual mode” (Stai per accedere al funzionamento in modo virtuale). Per eseguire un processo reale, modificare il setup nella finestra “Setup” (vedere Sezione 7.5.4).
- “Begin” (Inizio):
Una volta immesse tutte le informazioni, cliccare su “Begin”. Attendere la fine dell'inizializzazione. L'operazione può durare qualche secondo. Se è stato scelto il modo virtuale, comparirà il seguente messaggio:

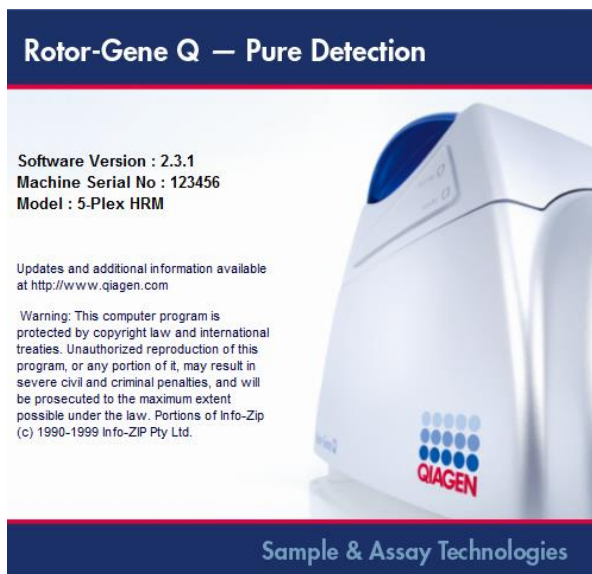


Se non è stata selezionata la casella "Run in Virtual Mode" (Processo in modo virtuale), il software viene inizializzato e si apre automaticamente.

"Exit Program" (Uscita dal programma): Cliccare su questo pulsante per uscire dal programma.

4.8 Versione software

Per trovare il numero della versione installata, cliccare su "Help" (Guida) poi su "About This Software..." (Informazioni sul software...).



Questa finestra visualizza informazioni generali sul software, fra cui la versione del software e il numero di matricola e il modello dello strumento.

Il software può essere liberamente copiato per essere usato all'interno dell'organizzazione che possiede un Rotor-Gene Q MDx. Il software non può essere copiato e distribuito a terzi al di fuori di tale organizzazione.

4.9 Software aggiuntivi su computer collegati agli strumenti Rotor-Gene Q MDx

Il software Rotor-Gene Q gestisce processi in cui il fattore tempo è determinante durante la PCR e il processo di acquisizione dati. Per questo è importante accertarsi che non siano attivi altri processi che utilizzino risorse significative del sistema, rallentando così il software Rotor-Gene Q. In particolare, è importante fare attenzione ai punti sotto elencati.

Si consiglia agli amministratori di sistema di considerare ogni impatto che una modifica al sistema può avere sulle risorse prima di applicarla.

4.9.1 Programmi antivirus

Siamo consapevoli della minaccia posta dai virus a ogni computer che scambia dati con altri computer. Il software Rotor-Gene è installato primariamente in ambienti in cui esistono già politiche locali che riducono tale minaccia al minimo. Tali politiche di solito richiedono l'uso di un particolare antivirus. A causa del numero stesso degli strumenti antivirus disponibili, QIAGEN non è in grado di prevedere il possibile impatto sul software Rotor-Gene di uno di questi strumenti attivo durante una PCR. Per poter ottenere risultati coerenti, gli amministratori di sistema devono pertanto garantire che durante una PCR:

- l'accesso ai file non sia intercettato da un antivirus
- non vengano effettuati aggiornamenti del database dei virus

- non vengano effettuate scansioni dei file.

Consigliamo vivamente di disattivare l'attività di scansione degli antivirus durante l'acquisizione di dati PCR in tempo reale. I compiti critici degli antivirus descritti sopra possono essere eseguiti in sicurezza, senza correre il rischio di influire sulle prestazioni dello strumento, quando il software Rotor-Gene Q non è utilizzato.

4.9.2 Strumenti di sistema

Molti strumenti di sistema possono utilizzare risorse significative anche senza interazione dell'utente. Ecco alcuni esempi tipici di tali strumenti:

- Indicizzazione dei file, eseguita in background da molte applicazioni office contemporanee
- Deframmentazione del disco, che impiega ugualmente un task in background
- Tutti i software che ricercano aggiornamenti in internet
- Strumenti di monitoraggio e gestione remoti

Tenere presente che, a causa della natura dinamica del mondo IT, questa lista può non essere completa e potrebbero essere diffusi nuovi strumenti non noti al momento in cui si scrive. E' importante che gli amministratori di sistema facciano attenzione che non sia attivo uno di questi strumenti durante una PCR.

4.9.3 Aggiornamenti del sistema operativo

Consigliamo vivamente di disattivare ogni processo automatico di aggiornamento del sistema operativo sul computer utilizzato per l'acquisizione dati sul Rotor-Gene Q MDx. Gli aggiornamenti disponibili sono attentamente monitorati da noi e provvederemo ad avvertire i clienti di tutti gli aggiornamenti considerati sicuri e importanti da installare.

4.10 Aggiornamento del software

Gli aggiornamenti del software sono disponibili sul sito QIAGEN www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx,

a cui si può accedere dal menu "Help" del software. Per scaricare il software, è necessario registrarsi online.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

5 Procedure di funzionamento — Hardware

Questa sezione descrive il funzionamento del Rotor-Gene Q MDx.

5.1 Tipi di rotore

Selezionare in primo luogo il rotore e il tipo di provette da usare. Sono disponibili 4 tipi di rotore per i vari tipi di provette.

Nota: Il rotore a 36 pozzetti e quello a 72 pozzetti sono in dotazione allo strumento. I rotori Rotor-Disc® sono accessori.

IMPORTANTE: Usare provette identiche in uno stesso processo. Non mischiare provette di tipo o marca differente per non compromettere l'uniformità ottica. Raccomandiamo di utilizzare provette QIAGEN che sono appositamente pensate per l'uso con il Rotor-Gene Q MDx (vedere Appendice C). Le provette di altra marca possono dare autofluorescenza, compromettendo l'affidabilità dei risultati. Inoltre le provette di marca diversa possono avere lunghezza e spessore diversi, con conseguente disallineamento del percorso ottico del Rotor-Gene Q MDx e della reazione nella provetta. QIAGEN si riserva la facoltà di negare l'assistenza tecnica per i problemi indotti da materiali plastici non certificati QIAGEN sul Rotor-Gene Q MDx.

IMPORTANTE: L'utilizzo di materiali plastici non certificati QIAGEN sul Rotor-Gene Q MDx può annullare la garanzia sullo strumento.

ATTENZIONE



Danni allo strumento

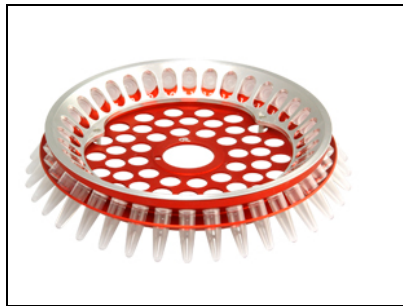
[C3]

Ispezionare visivamente il rotore e verificare che non sia danneggiato o deformato prima di ogni processo.

Rotore a 36 pozzetti

Il rotore a 36 pozzetti è di colore rosso. Il rotore a 36 pozzetti e l'anello di bloccaggio per rotore a 36 pozzetti

consentono l'uso di provette da 0,2 ml. Non occorre che le provette abbiano un tappo otticamente trasparente perché il Rotor-Gene Q MDx legge la fluorescenza dal fondo della provetta e non dall'alto. Si possono usare anche provette con tappo bombato.



Rotore a 72 pozzetti

Il rotore a 72 pozzetti è di colore blu. Il rotore a 72 pozzetti e l'anello di bloccaggio per rotore a 72 pozzetti sono utilizzati con le provette per strisce e relativi tappi da 0,1 ml, utilizzabili per volumi anche di soli 20 μ l. I tappi forniscono una chiusura sicura e affidabile.



Rotore Rotor-Disc 72

Il rotore Rotor-Disc 72 è di colore grigio scuro. Il rotore Rotor-Disc 72 e l'anello di bloccaggio per Rotor-Disc 72 consentono l'uso del Rotor-Disc 72. Il Rotor-Disc 72 è un disco con 72 pozzetti per elevata produttività. Per sigillare il

Rotor-Disc 72, si applica una pellicola polimerica trasparente sul rotore, sigillandola a caldo. La pellicola è di rapida applicazione e previene la contaminazione fornendo un sigillo robusto, duraturo e a prova di manomissione. Per ulteriori informazioni sul Rotor-Disc 72, vedere la Sezione 5.3.



Rotore Rotor-Disc 100

Il rotore Rotor-Disc 100 è di colore oro. Il rotore Rotor-Disc 100 e l'anello di bloccaggio per Rotor-Disc 100 consentono l'uso del Rotor-Disc 100. Il Rotor-Disc 100 è un disco con 100 pozzetti per elevata produttività. Il Rotor-Disc 100 è l'equivalente rotatorio di una piastra a 96 pozzetti, ma con l'aggiunta di 4 pozzetti di riferimento. Permette di integrare il Rotor-Gene Q MDx nei flussi di lavoro di un laboratorio a 96 pozzetti. I pozzetti in più possono essere comodamente usati per altri campioni, reazioni di controllo supplementari o reazioni di orientamento senza occupare le posizioni standard dei 96 pozzetti. Per una perfetta compatibilità con il flusso di lavoro a 96 pozzetti, il Rotor-Disc a 100 pozzetti utilizza nell'etichettatura le convenzioni della piastra a 96 pozzetti, cioè da A1–A12 a H1–H12. I 4 pozzetti aggiuntivi di riferimento sono etichettati R1–R4. Per ulteriori informazioni sul Rotor-Disc 100, vedere la Sezione 5.3.



Specifiche del rotore

Tipo rotore	Capacità pozzetto	N. campione	Tipo provetta	Volume di reazione raccomandato
Rotore a 36 pozzetti	200 μ l	36	Provette PCR, 0,2 ml	20-50 μ l
Rotore a 72 pozzetti	100 μ l	72	Provette per strisce e tappi, 0,1 ml	20-50 μ l
Rotore per Rotor-Disc 72	100 μ l	72	Rotor-Disc 72	20-25 μ l
Rotore per Rotor-Disc 100	30 μ l	100	Rotor-Disc 100	20-20 μ l

Nota: Il rotore a 36 pozzetti e il rotore a 72 pozzetti per il Rotor-Gene Q MDx non devono essere usati su strumenti Rotor-Gene 3000 a causa di incompatibilità dell'allineamento ottico. Continuare ad utilizzare i precedenti rotori a 36 e 72 posizioni con gli strumenti Rotor-Gene 3000.

5.2 Setup della reazione

IMPORTANTE: Per garantire risultati affidabili, utilizzare controlli adeguati per ogni processo.

Si possono preparare le reazioni con il blocco di caricamento a 96 provette x 0,2 ml (per provette PCR, 0,2 ml), il blocco di caricamento a 72 provette x 0,1 ml (per

provette per strisce e tappi, 0,1 ml preparate con pipetta monocanale), il blocco di caricamento da 72 x 0,1 ml multicanale (per provette per strisce e tappi, 0,1 ml preparate con pipetta multicanale), il blocco di caricamento per Rotor-Disc 72 (per il Rotor-Disc 72), o il blocco di caricamento per Rotor-Disc 100 (per il Rotor-Disc 100). Tutti i blocchi sono in alluminio e possono essere pre-raffreddati.

Il blocco di caricamento a 72 provette x 0,1 ml (nella figura) può contenere 18 provette per strisce e fino a otto provette da 0,5 ml, che possono essere usate per preparare la miscela master, e un massimo di sedici provette da 0,2 ml che possono essere usate per definire le curve standard. La procedura seguente descrive il setup della reazione con il rotore a 72 pozzetti. La stessa procedura può essere usata per il setup della reazione con il rotore a 36 pozzetti e accessori relativi.

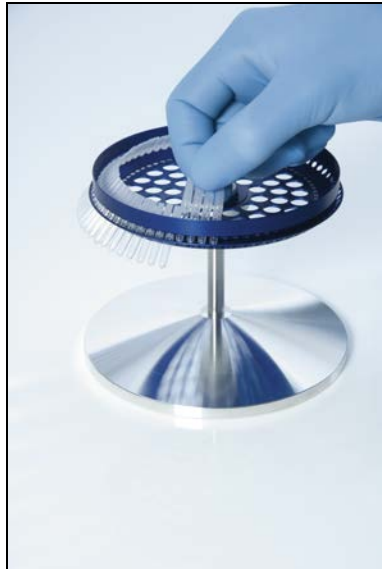
1. Inserire le provette per strisce nel blocco di caricamento e ripartirvi i componenti della reazione.



2. Inserire saldamente i tappi sulle provette per strisce e ispezionare visivamente per confermare la tenuta ermetica.



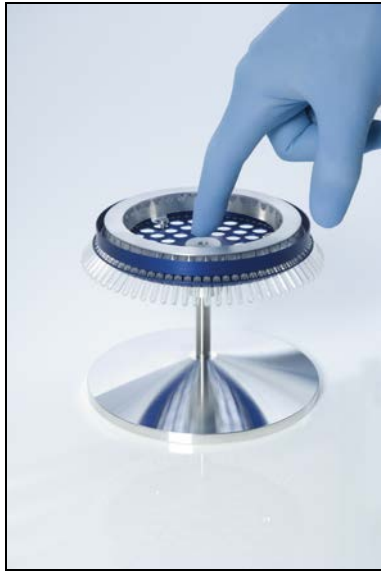
3. Inserire le provette per strisce nel rotore a 72 pozzetti accertandosi che ogni provetta sia correttamente inserita nel suo posto con il corretto orientamento. I campioni non raggiungono un allineamento ottimale sul sistema di rilevamento se non sono correttamente inseriti nel rotore. Potrebbe derivarne una riduzione del segnale di fluorescenza acquisito e della sensibilità di rilevamento. Con lo strumento è fornito in dotazione un portarotore che facilita il caricamento delle provette.



IMPORTANTE: Per ottenere la massima uniformità di temperatura, ogni posizione del rotore deve contenere una provetta. Riempiendo tutte le posizioni nel rotore si garantisce un flusso d'aria uniforme ad ogni provetta. Tenere a disposizione una serie di provette vuote con tappo da usare per riempire tutte le posizioni non utilizzate.

4. Inserire l'anello di bloccaggio per rotore a 72 pozzetti sul rotore stesso infilando i 3 perni di riferimento nei fori esterni del rotore.

L'anello di bloccaggio assicura che i tappi rimangano sulle provette durante il processo.



5. Inserire il tutto nella camera del Rotor-Gene Q MDx fino a sentire uno scatto sfruttando il perno di riferimento sul mozzo del rotore. Per la rimozione, basta spingere in basso il mozzo del rotore per sganciarlo ed estrarlo.



6. Chiudere il coperchio e definire il profilo del processo con il software Rotor-Gene Q.

5.3 Preparazione del Rotor-Disc

Il Rotor-Disc 72 o il Rotor-Disc 100 contengono 72 o 100 pozzetti rispettivamente in un disco in un solo pezzo destinato all'elevata produttività. Il Rotor-Disc 72 e il Rotor-Disc 100 non usano tappi. Al loro posto si applica sul tutto una pellicola termosigillante per Rotor-Disc, sigillata a caldo con apposito termosigillatore Rotor-Disc. La pellicola previene la contaminazione fornendo un sigillo robusto, duraturo e a prova di manomissione. Eseguire la termosigillatura del Rotor-Disc come descritto di seguito.

IMPORTANTE: Prima di iniziare questa procedura, leggere la scheda del prodotto fornita con il termosigillatore per Rotor-Disc.

1. Accendere il termosigillatore Rotor-Disc mediante l'interruttore sul retro a sinistra. Si accende la spia rossa "Power" (Corrente). Il termosigillatore Rotor-Disc richiede 10 minuti circa per raggiungere la temperatura d'esercizio, poi si accende una spia verde "Ready" (Pronto).
2. Scegliere un sigillo permanente o rimovibile.

Nota: Una volta che il termosigillatore Rotor-Disc è pronto, lo si può lasciare in funzione costantemente.

3. Inserire il Rotor-Disc nel blocco di caricamento Rotor-Disc usando la linguetta della posizione uno sul Rotor-Disc e i fori di guida per le provette sul blocco di caricamento Rotor-Disc.
4. Preparare le reazioni nel Rotor-Disc mediante pipettatura manuale o mediante un sistema automatico di manipolazione dei liquidi.



5. Per rimuovere la parte centrale da un foglio di pellicola termosigillante per Rotor-Disc, piegare leggermente il foglio, sollevare un lembo del pezzo centrale e rimuoverlo con cautela.
6. Posare la pellicola sul Rotor-Disc con il corretto orientamento mostrato dall'etichetta "SIDE UP" (ALTO). Verificare che l'etichetta "SIDE UP" sia posizionata in fondo al blocco di caricamento del Rotor-Disc. Il foro centrale della pellicola dovrebbe inserirsi agevolmente sul cilindro del blocco di caricamento Rotor-Disc e sopra il Rotor-Disc.



7. Infilare il gruppo nel termosigillatore Rotor-Disc mediante le guide sul lato del blocco di caricamento Rotor-Disc. Controllare che il blocco di caricamento Rotor-Disc sia stato spinto fino in fondo.



8. Per attivare il meccanismo sigillante, prima premere verso il basso la barra blu anodizzata sopra il termosigillatore, poi spingere indietro il fermo nero.



9. Quando si abbassa il meccanismo sigillante, si illumina la spia arancione "Sealing" (Sigillatura in corso). Se il blocco di caricamento Rotor-Disc non è in posizione corretta, l'allarme è dato da un segnale acustico.
10. La fine della sigillatura è segnalata da un bip continuo e dal lampeggiamento della spia arancione "Sealing". Spingere in basso la barra blu anodizzata per riportare il meccanismo sigillante nella posizione originale e rilasciarlo.

IMPORTANTE: Non continuare la sigillatura oltre il limite indicato dal segnale acustico o il Rotor-Disc potrebbe deformarsi.

Nota: Per segnalare il mancato rilascio accidentale del meccanismo di bloccaggio, la spia arancione "Sealing" lampeggiante si illumina a luce continua, mentre il bip continuo cambia in suono intermittente.

11. Estrarre il blocco di caricamento Rotor-Disc dal termosigillatore Rotor-Disc. Attendere 10 secondi circa per raffreddare la pellicola. Eliminare la pellicola in eccesso spingendola verso il basso e staccandola. Non tirare verso l'alto la pellicola in eccesso.
12. Rimuovere il Rotor-Disc dal blocco di caricamento Rotor-Disc.
13. Caricare il Rotor-Disc nel rotore mediante la linguetta di riferimento posizione uno come guida per un corretto orientamento.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

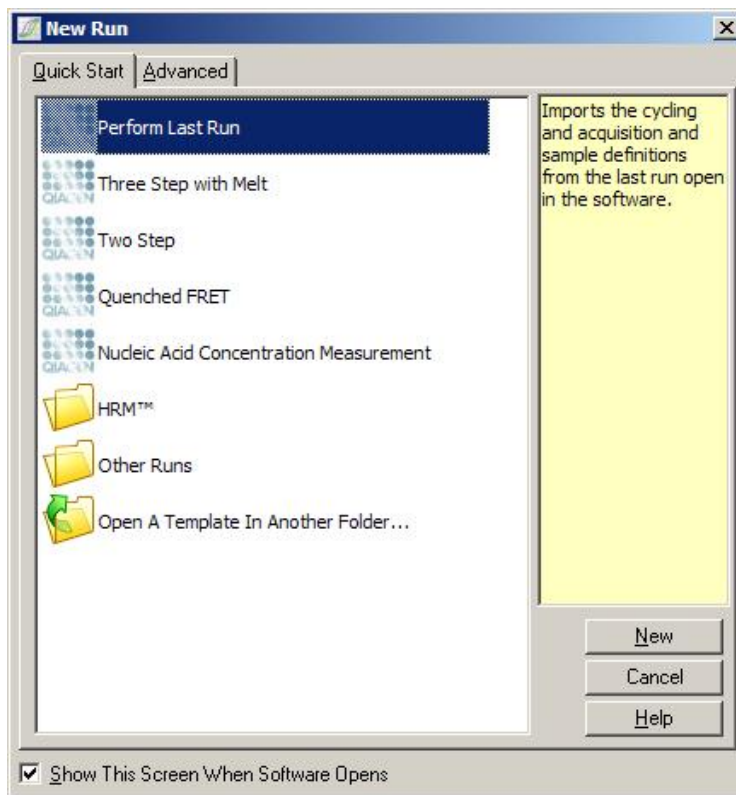
6 Procedure di funzionamento — Software

Si possono preparare nuovi processi con le procedure guidate “Quick Start” o “Advanced” (Avanzata), visualizzate quando si avvia il software. La procedura guidata “Quick Start” è stata pensata per consentire all'utente di avviare il processo il più rapidamente possibile. La procedura guidata “Advanced” consente più opzioni, quali la configurazione di “Gain Optimization” (Ottimizzazione gain) e l'impostazione dei volumi. Per comodità, le procedure guidate hanno diversi moduli con condizioni di processo e canali di acquisizione predefiniti. Per cambiare il tipo di procedura guidata, selezionare la scheda opportuna in alto nella finestra “New Run” (Nuovo processo).

6.1 Procedura guidata “Quick Start”

La procedura guidata “Quick Start” permette all'utente di avviare il processo il più rapidamente possibile. L'utente può scegliere da una serie di modelli di uso comune e immettere un minimo di parametri per cominciare. La procedura guidata “Quick Start” ipotizza un volume di reazione di 25 μl . Per altri volumi di reazione, vedere la procedura guidata avanzata (vedere Sezione 6.2).

Come primo passo, selezionare il modello desiderato per il processo cliccando due volte sul modello nella lista della finestra “New Run”.



“Perform Last Run” (Eseguire ultimo processo): “Perform Last Run” usa le definizioni di processo, acquisizione e campioni dell'ultimo processo aperto nel software.

“Three Step with Melt” (Tre fasi con fusione): Questo è un profilo di ciclo a tre fasi con una curva di fusione con acquisizione dati sul canale verde.

“Two Step” (Due fasi): Questo è un profilo di ciclo a due fasi con acquisizione dati sui canali verde, giallo, arancio e rosso.

- “Quenched FRET”: Questo è un profilo di ciclo a tre fasi e una curva di fusione. Diversamente da “Three Step with Melt”, l'acquisizione è alla fine della fase di annealing.
- “Nucleic Acid Concentration Measurement” (Misurazione concentrazione acidi nucleici): Questo è uno stampo di default per misurare la concentrazione degli acidi nucleici mediante coloranti intercalanti.
- “HRM”: Questa cartella contiene profili di fusione ad alta risoluzione.
- “Other Runs” (Altri processi): Questa cartella contiene profili aggiuntivi.

Con la procedura guidata si possono alterare i profili di ciclo e acquisizione di tutti i modelli.

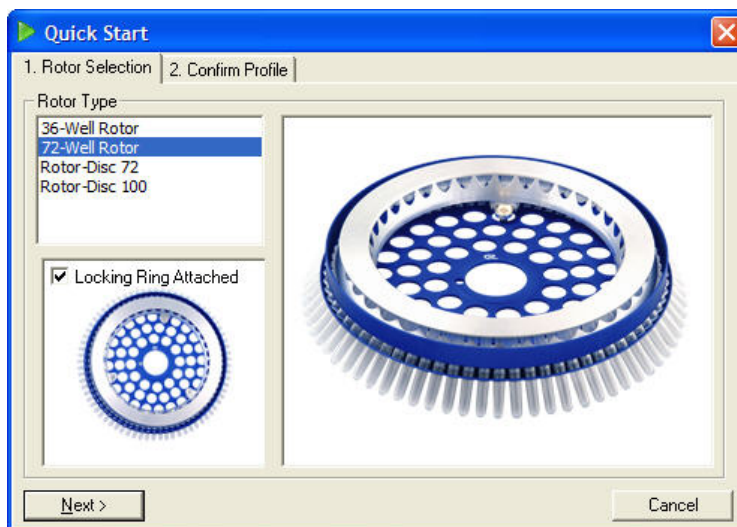
Nota: I modelli definiti dall'utente possono essere aggiunti alla lista della procedura guidata “Quick Start” copiando o salvando i file *.ret in **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates**. Dopo aver copiato un file in questo percorso, il modello comparirà nell'elenco sotto forma di icona. Volendo icone personalizzate per i propri modelli, creare un'immagine *.ico con lo stesso nome di file del modello.

Si possono creare sottocartelle per modelli relativi a un gruppo. Questo consente l'organizzazione dei modelli, cosa che potrebbe essere comoda per es. se lo stesso strumento è usato da più utenti.

6.1.1 Selezione del rotore

Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore dall'elenco.

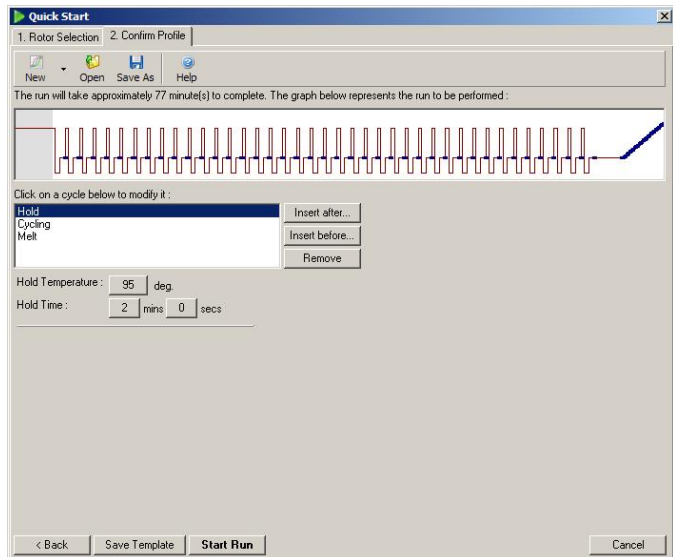
Selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio applicato) e cliccare su "Next" (Avanti).



6.1.2 Conferma del profilo

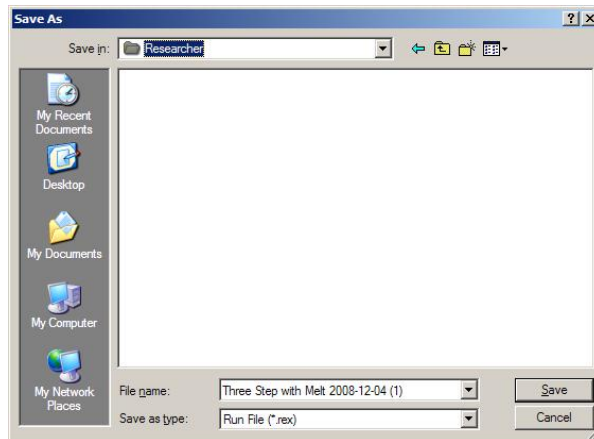
Si importano qui le condizioni di ciclo e i canali di acquisizione del modello scelto. Si possono apportare modifiche nella finestra “Edit Profile” (Modifica profilo) (vedere Sezione 6.2.4).

Per avviare un processo, cliccare su “Start Run” (Avvia processo). È anche possibile salvare il modello prima di iniziare il processo cliccando su “Save Template” (Salva modello).



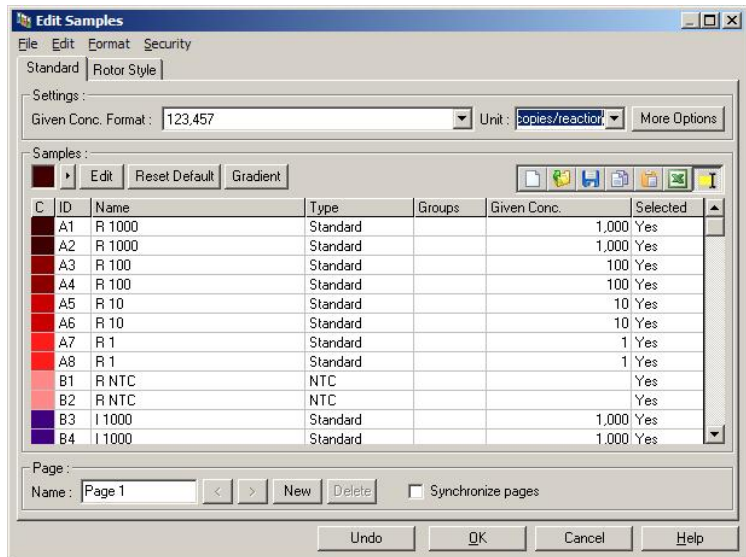
6.1.3 Salvataggio del processo

Dopo aver cliccato su “Start Run”, si apre la finestra “Save As” (Salva con nome). Il processo può essere salvato dove desiderato dall'utente. Il processo riceve un nome composto dal modello usato e dalla data del processo. Viene incluso anche un numero di serie (1, 2 ecc.) per consentire di denominare automaticamente i vari cicli eseguiti con lo stesso modello nella stessa data.



6.1.4 Preparazione del campione

Una volta avviato il processo, la finestra “Edit Samples” (Modifica campioni) permette di definire e descrivere i campioni.

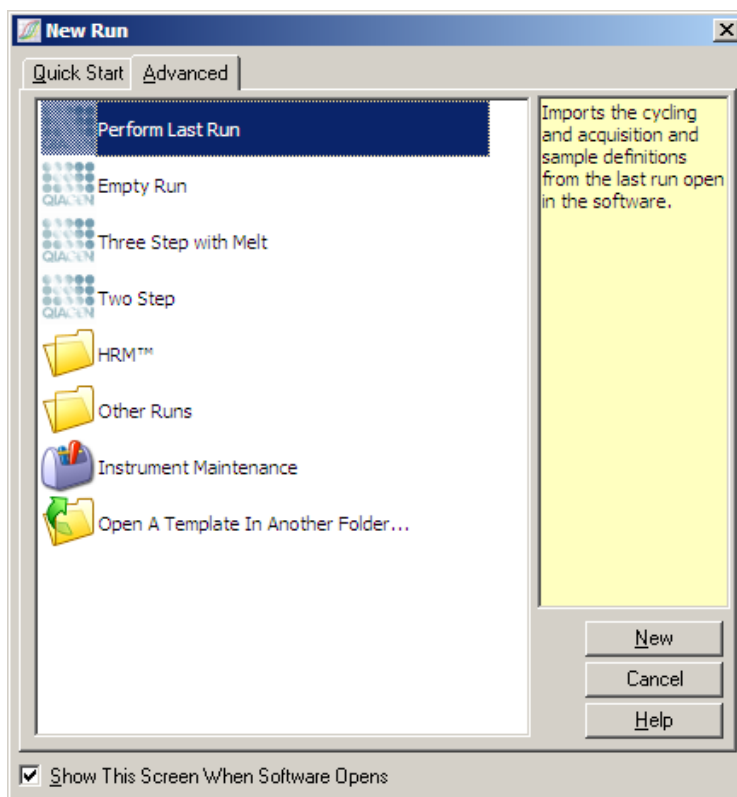


La finestra “Edit Samples” si apre dopo che il processo è stato avviato, in modo che l'utente può utilizzare questo tempo per immettere i nomi dei campioni. Per maggiori informazioni sulla modifica delle definizioni dei campioni nella finestra “Edit Samples”, vedere la Sezione 7.8.4.

6.2 Procedura guidata “Advanced”

La procedura guidata “Advanced” dà accesso ad opzioni non disponibili nella procedura “Quick Start”, quali la configurazione dell'ottimizzazione del gain.

Per usare la procedura guidata “Advanced”, selezionare un modello cliccando due volte sul nome dello stesso nella lista sotto la scheda “Advanced” della finestra “New Run”.



Le opzioni fornite da questa finestra sono simili a quelle della procedura guidata “Quick Start” (Sezione 6.1).

“Perform Last Run” (Eseguire ultimo processo): “Perform Last Run” importa le definizioni di ciclo, acquisizione e campioni dell'ultimo processo aperto nel software.

“Empty Run” (Processo a vuoto): Si tratta di un processo a vuoto che permette all'utente di definire tutti i parametri del profilo.

“Three Step with Melt” (Tre fasi con fusione): Questo è un profilo di ciclo a tre fasi con una curva di fusione con acquisizione dati sul canale verde.

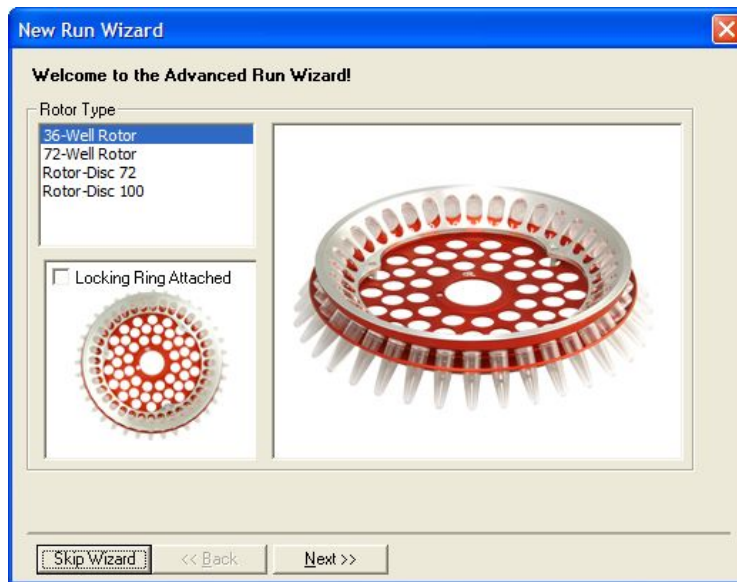
“Two Step” (Due fasi):	Questo è un profilo di ciclo a due fasi con acquisizione dati sul solo canale verde, per accelerare il processo.
“HRM”:	Questa cartella contiene 2 profili di fusione ad alta risoluzione.
“Other Runs” (Altri processi):	Questa cartella contiene profili aggiuntivi.
“Instrument Maintenance” (Manutenzione strumento):	Contiene il modello usato durante la verifica ottica della temperatura (OTV). Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 10. Questo modello è bloccato per garantire il funzionamento sempre perfetto del profilo.

Nota: I modelli definiti dall'utente possono essere aggiunti alla lista dei modelli copiando o salvando i file ***.ret** in **C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates**. Dopo aver copiato un file in questo percorso, il modello comparirà nell'elenco sotto forma di icona.

6.2.1 Finestra “New Run Wizard” 1

Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore dall'elenco.

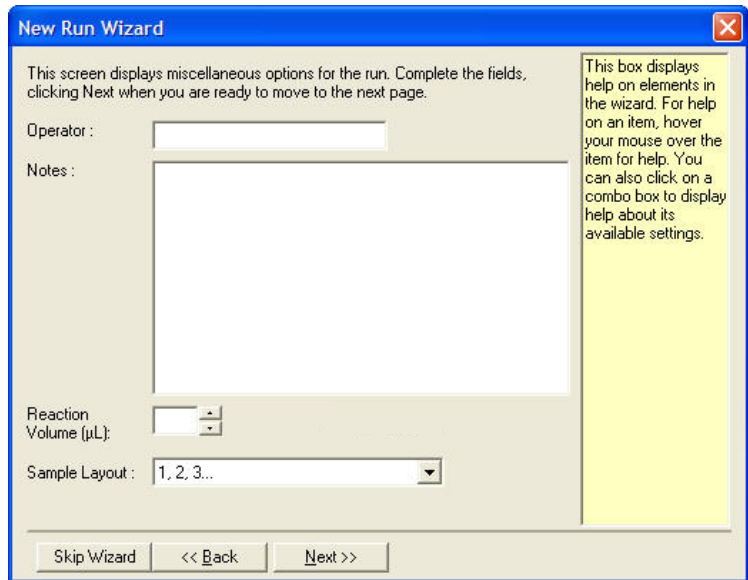
Selezionare la casella “Locking Ring Attached” e cliccare su “Next”.



6.2.2 Finestra “New Run Wizard” 2

Nella finestra successiva si possono immettere il nome dell'utente e note sul processo. Si deve anche immettere il volume della reazione.

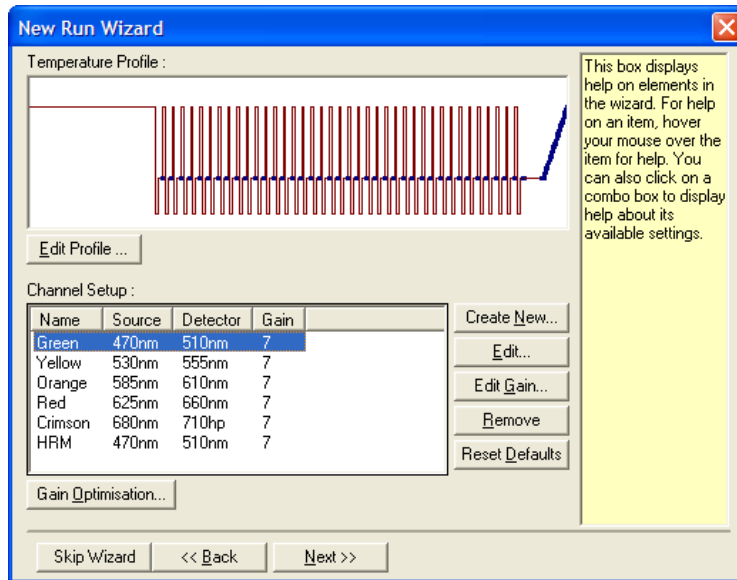
Se nella finestra 1 è stato selezionato il rotore a 72 pozzetti, nel menu a tendina sono disponibili tre opzioni di “Sample Layout” (Layout campioni). “1, 2, 3...” è l'opzione di default. La maggior parte degli utenti sceglie questa opzione. Si dovrebbe invece scegliere “1A, 1B, 1C...” quando i campioni sono stati caricati in provette in strisce da 0,1 ml con una pipetta a 8 canali. Se opportuno, si può scegliere il layout “A1, A2, A3...”.



6.2.3 Finestra “New Run Wizard” 3

In questa finestra si possono modificare il “Temperature Profile” (Profilo temperatura) e il “Channel Setup” (Setup canale). Se si è cliccato su “Edit Profile...”, si apre la finestra “Edit Profile” che permette di modificare le condizioni del ciclo e di selezionare i canali di acquisizione (Sezione 6.2.4).

Dopo aver modificato il profilo, cliccare sul pulsante “Gain Optimisation...” per aprire la finestra “Gain Optimisation” (vedere pag. 6-24).



6.2.4 “Edit Profile”

La finestra “Edit Profile” permette di specificare le condizioni del ciclo e i canali di acquisizione. Il profilo iniziale visualizzato è basato sul modello scelto durante l'impostazione del processo (vedere pag. 6-1). Il profilo è visualizzato in forma grafica. La lista dei segmenti del profilo è visualizzata sotto la visualizzazione grafica. Questa lista può includere “Hold” (pag. 6-13), “Cycling” (pag. 6-14), “Melt” (pag. 6-17) o “HRM” se lo strumento ha un canale HRM (pag. 6-18).

Ogni stadio del profilo può essere modificato cliccando sull'area appropriata del display grafico o sul nome nella lista e poi cambiando le impostazioni visualizzate.

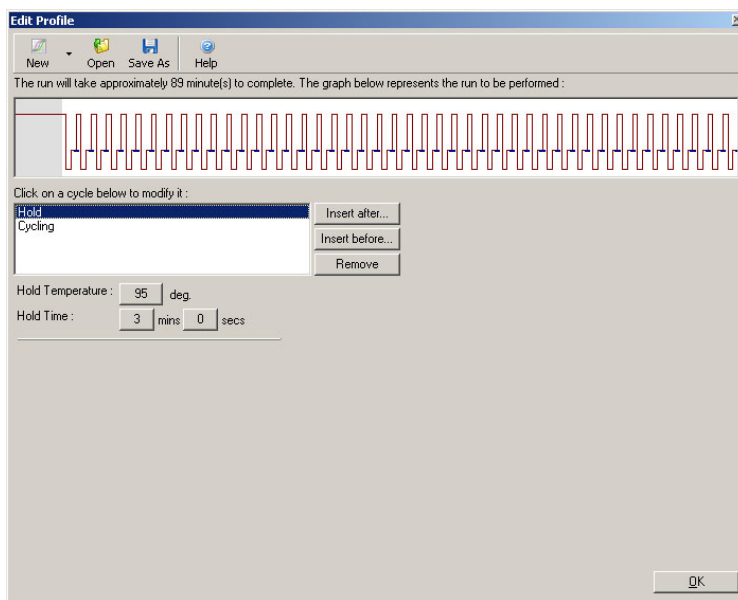
“Insert after...” Permette di aggiungere un nuovo ciclo (Inserire dopo): dopo quello selezionato.

“Insert before...” Permette di aggiungere un nuovo ciclo (Inserire prima): prima di quello selezionato.

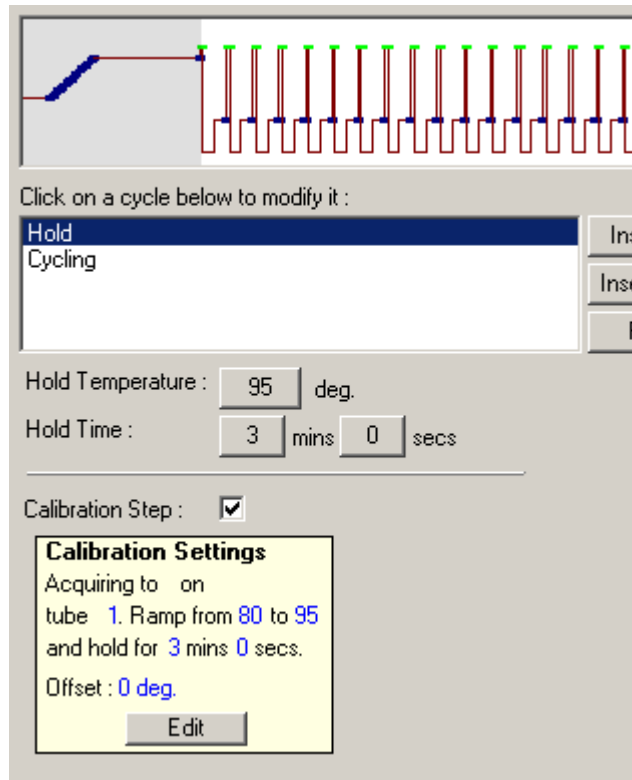
“Remove” (Rimuovi): Rimuove il ciclo selezionato dal profilo.

“Hold”

Il comando “Hold” (Tieni) impone al Rotor-Gene Q MDx di rimanere alla temperatura designata per un tempo definito. Per cambiare la temperatura, cliccare su “Hold Temperature” (Mantieni temperatura) e immettere la temperatura desiderata con la tastiera o la barra scorrevole. Per cambiare la durata del comando “Hold”, cliccare sui pulsanti “Hold Time” (Durata Hold), “mins” e “secs”.



Se si esegue un ciclo di denaturazione ottica, si può usare “Hold” come fase di calibrazione. In questo caso, viene eseguita una fusione di calibrazione prima di “Hold”. Questa è la configurazione di default per il primo “Hold” del processo, che però può essere cambiata se lo si desidera.



Per maggiori informazioni sul ciclo di denaturazione ottica, vedere pag. 6-19.

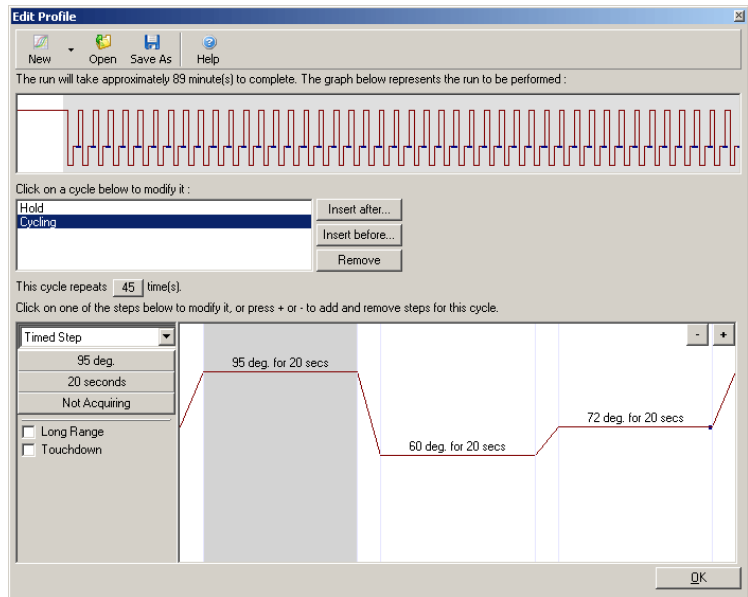
“Cycling”

Il comando “Cycling” (Ciclare) ripete le fasi definite dall'utente di temperatura e tempo per un numero specificato di volte. Per impostare il numero di ripetizioni, usare il pulsante “This cycle repeats X time(s).” (Questo ciclo si ripete X volte).

Viene visualizzato in forma grafica un singolo ciclo (vedere schermata seguente). È possibile modificare ogni fase del ciclo. La temperatura può essere cambiata trascinando in su o in giù la linea della temperatura nel grafico. La durata della fase può essere cambiata trascinando a destra o sinistra il limite della temperatura nel grafico. In alternativa,

clickare sulla fase e servirsi dei pulsanti di temperatura e tempo sulla sinistra del grafico.

Si possono aggiungere o rimuovere fasi dal ciclo mediante i pulsanti “-” e “+” in alto a destra nel grafico.



“Long Range”
(Range lungo):

Selezionando questa casella si aumenta il tempo di hold della fase selezionata di un secondo per ogni nuovo ciclo.

“Touchdown”:

Selezionando questa casella si diminuisce la temperatura di un numero specifico di gradi per un numero specifico di cicli iniziali. Questo è poi visualizzato sul display.

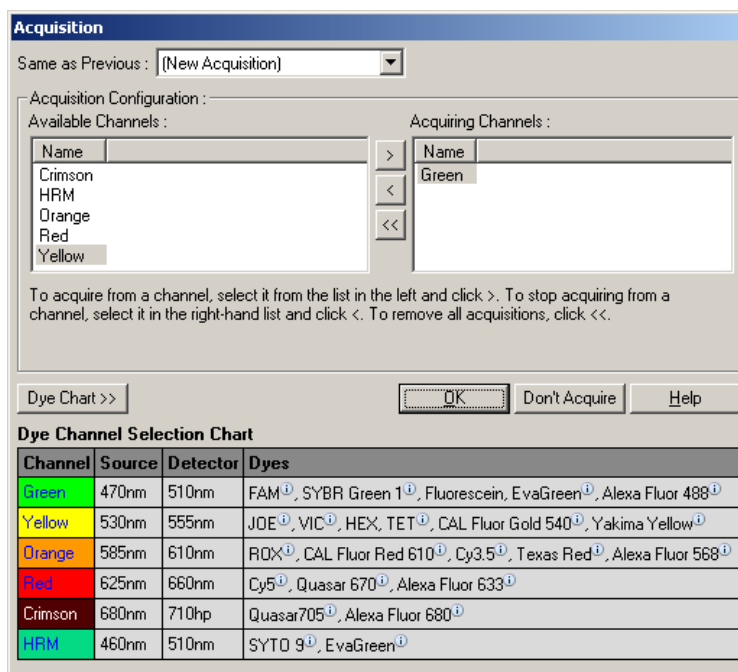
Acquisizione




I dati possono essere acquisiti su qualsiasi canale in qualsiasi fase del ciclo. Per impostare un canale per l'acquisizione dati, clickare sul pulsante “Not Acquiring” (Senza acquisizione) (se era stato già impostato un canale per

acquisizione in questa fase, i canali di acquisizione sono elencati qui).



Dopo aver cliccato su “Not Acquiring”, si apre la finestra “Acquisition” (Acquisizione).



Per impostare un canale d'acquisizione, selezionare il canale e spostarlo dall'elenco "Available Channels" (Canali disponibili) nell'elenco "Acquiring Channels" (Canali acquisizione) mediante il pulsante . Per rimuovere un canale selezionato dall'elenco "Acquiring Channels", usare il pulsante . Il pulsante  rimuove tutti i canali dall'elenco "Acquiring Channels". Anche cliccando il pulsante "Don't Acquire" (Non acquisire) si rimuovono tutte le acquisizioni da questa fase.

Se nel profilo è inclusa più di una sequenza di cicli, i dati acquisiti possono essere allegati ai dati acquisiti da cicli precedenti. Usare il menu a tendina "Same as Previous" (Come precedente) per selezionare la fase del ciclo a cui si devono allegare i dati.

La "Dye Channel Selection Chart" (Tabella di selezione canale colorante) serve all'utente per decidere qual è il canale idoneo per il colorante che si intende usare. I coloranti indicati dalla tabella sono quelli di uso più comune, senza con questo porre limiti allo strumento.

Le opzioni di acquisizione descritte sopra sono applicabili anche alle fasi "Melt" (Fusione), tranne che non è possibile allegare dati di acquisizione con il menu "Same as Previous".

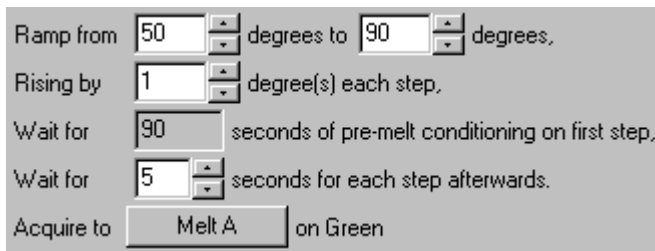
Fusione e ibridazione

Una "Melt" (Fusione) è una rampa tra 2 temperature, da quella più bassa a quella più alta. Il range di temperature ammesso è di 35–99°C.

Per impostare una "Melt", specificare la temperatura iniziale, la temperatura finale, gli incrementi di temperatura, la durata del tempo di sosta alla prima temperatura di acquisizione prima di iniziare la rampa, la durata della sosta per ogni incremento e i canali di acquisizione.

Tra le 2 temperature sarà generata una rampa. Se la temperatura iniziale è superiore a quella finale, il nome della fase diventa "Hybridisation" (Ibridazione). L'opzione "Acquiring To" (Acquisizione verso), impostata per "Melt A"

nella schermata sottostante, può essere cambiata cliccando sul pulsante. Sarà visualizzata la finestra “Acquisition” e si potranno selezionare i canali.



Ramp from 50 degrees to 90 degrees.
Rising by 1 degree(s) each step.
Wait for 90 seconds of pre-melt conditioning on first step.
Wait for 5 seconds for each step afterwards.
Acquire to on Green

Quando si esegue una fusione standard, la temperatura viene aumentata per incrementi di 1°C, attendendo 5 secondi prima di ogni acquisizione. Il Rotor-Gene Q MDx può essere configurato per eseguire fusioni con incrementi di 0,02°C. Il tempo minimo di sosta (“Hold”) tra le fasi termiche varia a seconda del numero di gradi fra ogni fase.

High Resolution Melt (Fusione ad alta risoluzione)

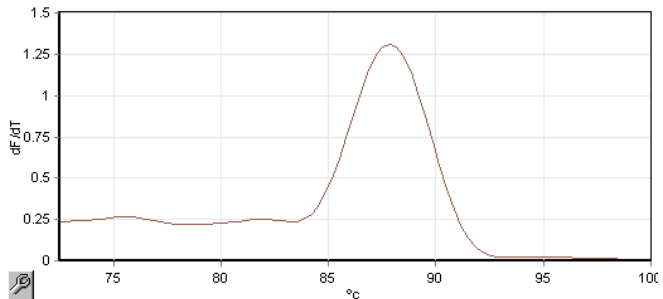
L'analisi di fusione ad alta risoluzione (HRM) caratterizza i campioni di DNA a doppio filamento sulla base del loro comportamento di dissociazione (fusione). È simile all'analisi classica della curva di fusione, ma fornisce molte più informazioni per una gamma più vasta di applicazioni. I campioni possono essere discriminati in base a sequenza, lunghezza, tenore di GC o complementarità dei filamenti, anche di singoli cambiamenti delle coppie base.

L'analisi HRM può essere eseguita solo su strumenti su cui siano installati hardware e software per HRM. I dati vengono acquisiti mediante fonti e rilevatori per HRM specializzati. L'analisi HRM include anche l'opzione di eseguire l'ottimizzazione del gain prima dell'inizio della fusione. Eseguita l'analisi HRM, i dati possono essere analizzati con il software di analisi HRM (Sezione 11).

Ciclo di denaturazione ottica

Il ciclo di denaturazione ottica è una tecnica molto interessante, disponibile sul Rotor-Gene Q MDx, che esegue l'analisi di fusione in tempo reale per determinare il picco di fusione di un campione di riferimento. Questo indica una denaturazione del prodotto PCR con precisione maggiore che non impostando una particolare temperatura di denaturazione per un tempo di sosta. Per eseguire questa tecnica, è sufficiente inserire una provetta di riferimento di prodotto PCR nella posizione 1 del rotore. La provetta di riferimento deve anche contenere un rilevatore chimico che consente di rilevare la dissociazione dei filamenti.

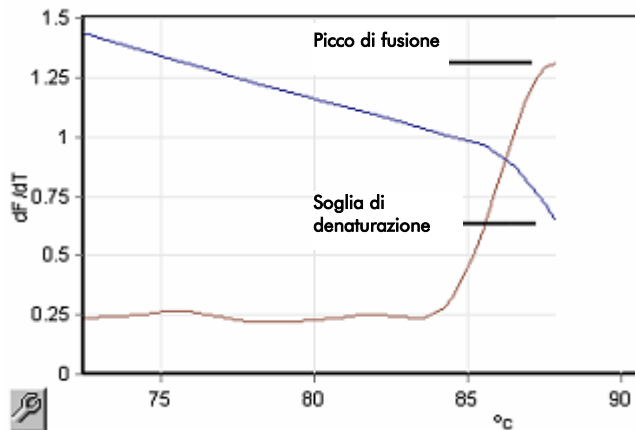
Quando si riscalda fino alla temperatura iniziale di denaturazione, per default viene eseguita una fusione sul canale verde da 80°C a 95°C. I parametri di questa fusione iniziale possono essere modificati dall'utente. Da questi dati si genera una curva di fusione che viene analizzata automaticamente.



Il picco di fusione viene confrontato con i dati grezzi per ottenere una soglia di denaturazione. Poi, ad ogni fase del ciclo di denaturazione ottica, lo strumento viene riscaldato il più rapidamente possibile con acquisizione continua dei dati. Quanto la provetta di riferimento ha raggiunto il livello di soglia della fluorescenza di denaturazione, lo strumento viene raffreddato immediatamente e passa alla fase successiva programmata nel ciclo. Durante il ciclo, il picco non viene calcolato. Il livello di fluorescenza viene invece

confrontato con il picco di fusione, designando così la soglia di denaturazione.

Nel grafico seguente, sono stati sovrapposti i valori grezzi della fluorescenza e la prima derivata. Questo mostra la corrispondenza tra la soglia di denaturazione e il picco di fusione ottenuto durante la calibrazione.



Per eseguire il ciclo di denaturazione ottica, occorrono:

- Un prodotto PCR preamplificato da inserire nella posizione 1 del rotore. Questo campione deve contenere lo stesso prodotto PCR dei campioni che interessano e un rilevatore chimico per monitorare la dissociazione del prodotto PCR.
- Un profilo di denaturazione ottica. Si può creare un nuovo profilo, oppure modificarne uno esistente (vedere particolari in seguito).

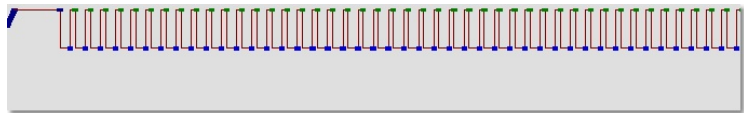
Un ciclo di denaturazione ottica si presenta quasi identico agli altri cicli. La differenza principale consiste nella fase di fusione inserita automaticamente all'inizio del profilo e nel profilo netto della fase di denaturazione durante il ciclo. Il ciclo di denaturazione ottica non richiede tempi di sosta definiti in quanto la dissociazione del prodotto viene monitorata ad ogni ciclo.

Per eseguire questa tecnica, occorrono le seguenti informazioni sul processo:


- La temperatura iniziale di denaturazione. È la stessa temperatura della fase di Denaturazione in un profilo di ciclo standard.
- La posizione della provetta del campione PCR che produrrà una curva di fusione sul canale verde.
- È obbligatorio definire un profilo di ciclo di denaturazione ottica.

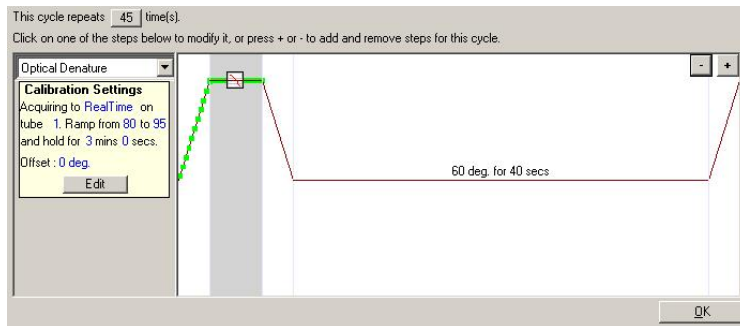
Creare un nuovo ciclo di denaturazione ottica come segue.

1. Aprire la finestra "Edit profile". Cliccare su "New" (Nuovo). Nella finestra che si apre, cliccare sul pulsante "Insert after" e selezionare "New Cycling" (Nuovo ciclo) dal menu. Selezionare una della fasi di temperatura cliccando sul grafico. Nel menu a tendina selezionare "Optical Denature" (Denaturazione ottica) al posto di "Timed Step" (Fase temporizzata). Viene visualizzato un profilo di default contenente una fase di denaturazione e una fase di ciclo di denaturazione ottica.

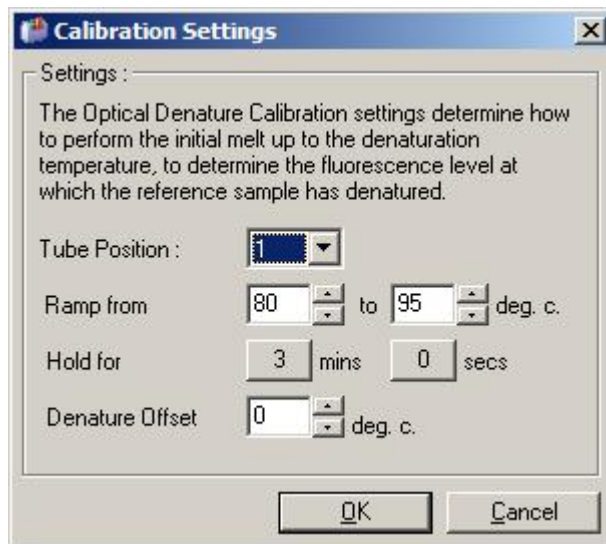


La regione a rampa all'inizio del processo rappresenta il processo di calibrazione. I puntini verdi rappresentano le acquisizioni effettuate per ogni ciclo durante il riscaldamento. I puntini blu rappresentano l'acquisizione alla fine della fase di annealing a 60°C. Tenere presente che, mentre il profilo mostra ogni fase con la stessa temperatura di denaturazione, questo caso potrebbe essere diverso. Se il campione richiede un po' più di tempo per la fusione verso la fine del processo, il processo di denaturazione ottica attende la fusione in base ai dati di fluorescenza e non in base al tempo. Per questo motivo la traccia della temperatura può variare da un ciclo all'altro.

2. Cliccare sulla prima metà del grafico con il simbolo della denaturazione ottica . Sulla sinistra dello schermo compaiono le informazioni “Calibration Settings” (Impostazioni calibrazione).

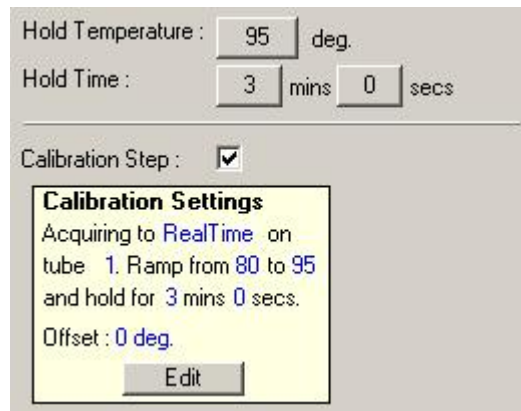


3. Le informazioni “Calibration Settings” sono di norma corrette. Per modificarle, se necessario, cliccare su “Edit” (Modifica). Si apre la finestra “Calibration Settings”.



4. Accertarsi di quanto segue:
- La provetta indicata in “Tube Position” contiene un prodotto PCR che visualizzerà un picco di fusione sul canale verde.
 - La temperatura finale della rampa non brucia il campione, ma è abbastanza elevata da consentirne la fusione.
 - Il tempo di sosta è sufficiente a denaturare il campione.
 - L'offset di denaturazione impostato è idoneo. Il valore di default di 0°C è idoneo per la maggior parte delle fusioni. Le fusioni con transizioni molto nette possono richiedere un offset di denaturazione tra -0,5°C e -2°C, definito dall'utente, per assicurare il rilevamento della transizione.

È possibile anche definire una fase di denaturazione introducendo una nuova fase di sosta. Cliccare su “Insert before” e selezionare “New Hold at Temperature” (Nuova sosta a temperatura) dal menu. Saranno visualizzate le impostazioni di calibrazione.

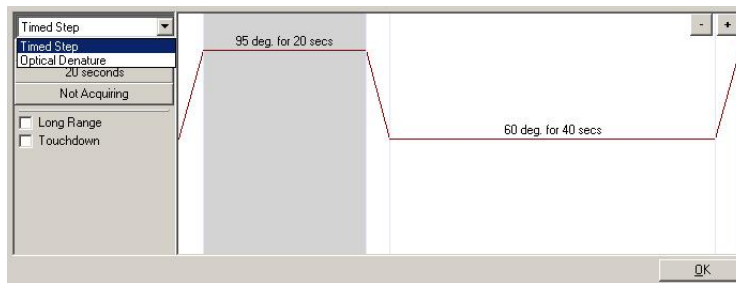



Le impostazioni di calibrazione sono sincronizzate con quelle di denaturazione, quindi una modifica del tempo di sosta nella fase di denaturazione aggiorna automaticamente il tempo di sosta nella calibrazione. Questo perchè il processo

di calibrazione e la denaturazione sono equivalenti nel ciclo di denaturazione ottica.

Modifica di una fase esistente per usare il ciclo di denaturazione ottica

Per cambiare una fase di denaturazione esistente in una sequenza di ciclo, selezionare il ciclo nell'elenco della finestra "Edit Profile". Quindi selezionare la fase di denaturazione cliccandoci sopra sul display.



Cliccare sul menu a tendina e selezionare "Optical Denature". La temperatura e il tempo di sosta vengono rimossi ed è visualizzata l'icona "Optical Denature" .

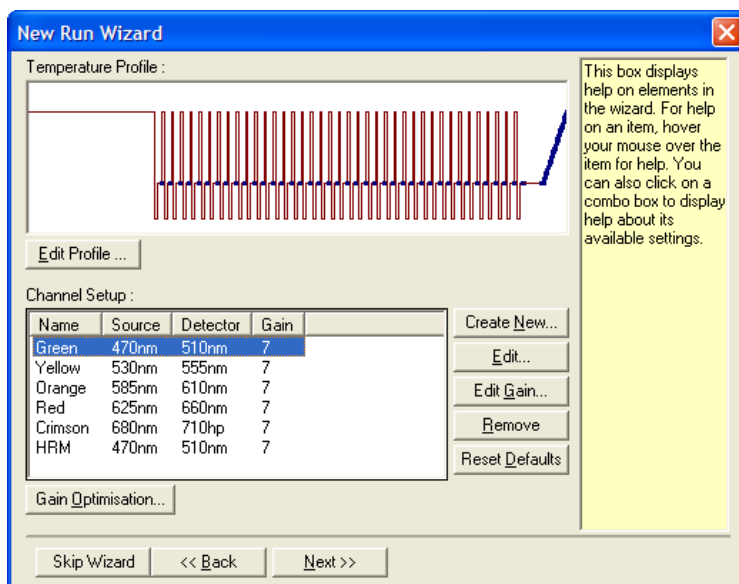
Ottimizzazione gain

Quando si prepara un nuovo processo, è utile servirsi della funzione "Gain Optimisation". Questo permette di ottimizzare il gain con un'impostazione che fornirà il range desiderato di fluorescenza all'avvio ad una temperatura determinata (di solito quella in cui si realizza l'acquisizione dati) in ciascuno dei canali in acquisizione. Lo scopo dell'ottimizzazione del gain è di assicurare che siano raccolti tutti i dati entro il range dinamico del rivelatore. Se il gain è troppo basso, il segnale si perde nel rumore di fondo. Se il gain è troppo alto, tutto il segnale si perde fuori scala (saturato).

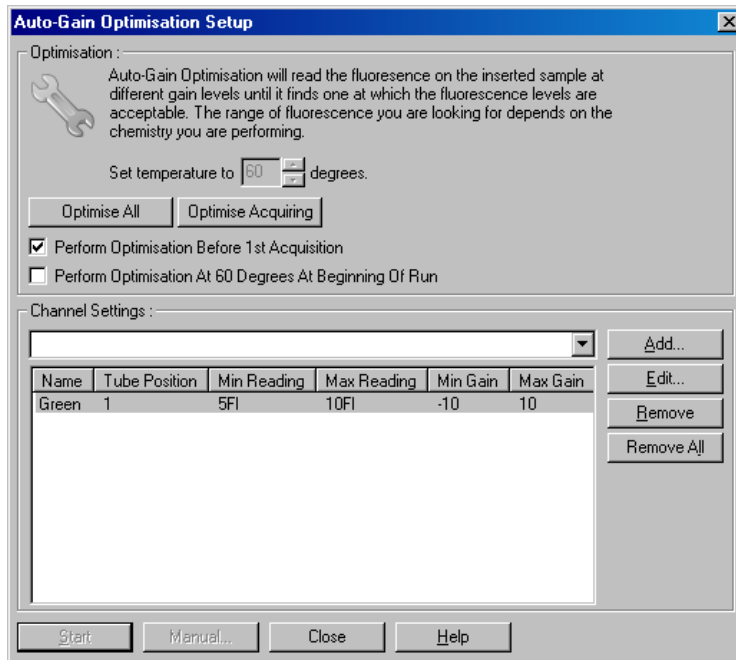
Il range di gain per ogni canale va da -10 a 10, dove -10 rappresenta la sensibilità minima e 10 quella massima.

Quando si eseguono reazioni per la prima volta, consigliamo di preparare un campione di prova contenente tutti i componenti della reazione. Inserire il campione di prova nel Rotor-Gene Q MDx e usare “Gain Optimisation” per determinare l'impostazione migliore del gain. Se il gain scelto con “Gain Optimisation” dà un segnale poco efficace, aumentare il “Target Sample Range” (Range campione target). Se dà un segnale saturo, diminuire il “Target Sample Range”.

Per eseguire la “Gain Optimisation”, cliccare sul pulsante “Gain Optimisation...” nella finestra “New Run Wizard 3” (vedere Sezione 6.2.3).



Viene visualizzata la finestra “Auto-Gain Optimisation Setup” (Setup ottimizzazione gain automatica). La finestra consente l'ottimizzazione aggiustando automaticamente le impostazioni del gain fino a che i valori per tutti i canali selezionati non cadano dentro o sotto una certa soglia.



“Set temperature to” (Impostare temperatura a):

Prima della lettura, il Rotor-Gene Q MDx si sarà raffreddato o riscaldato per corrispondere alla temperatura specificata. Per default, questa temperatura viene impostata come temperatura d'acquisizione.

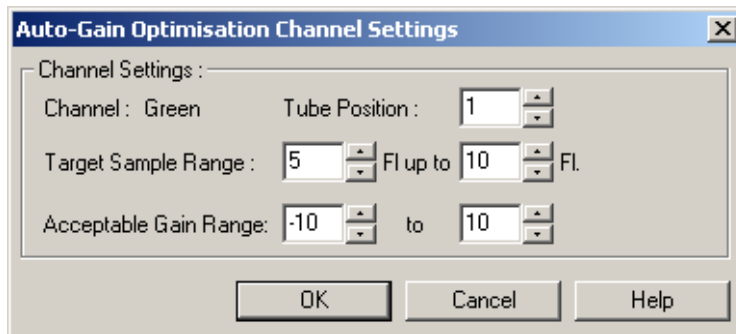
“Optimise All/Optimise Acquiring” (Ottimizza tutto/Ottimizza acquisizione):

“Optimise All” tenta di ottimizzare tutti i canali noti al software. “Optimise Acquiring” ottimizza solo i canali utilizzati nel profilo termico definito nel processo (ciclo e fusione).

"Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Eseguire ottimizzazione prima della 1° acquisizione):	Selezionare questa casella per eseguire la "Gain Optimisation" al primo ciclo in cui si verifica l'acquisizione dati. Questa opzione è consigliata per "l'Auto-Gain Optimisation".
"Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run" (Eseguire ottimizzazione a [x] gradi all'inizio del processo):	Selezionare questa casella per eseguire la "Gain Optimisation" prima di iniziare il processo. Il Rotor-Gene Q MDx si riscalda alla temperatura specificata, viene eseguita la "Gain Optimisation" e poi inizia il ciclo dalla prima fase, di solito una fase di denaturazione. Si può scegliere questa opzione se la "Gain Optimisation" eseguita durante il processo comporterebbe un tempo eccessivo dedicato alla fase iniziale. Di solito si preferisce "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" perchè la "Gain Optimisation" viene così eseguita rispettando al massimo le condizioni di processo.
"Channel Settings" (Impostazioni canale):	Questo menu a tendina permette di aggiungere dei canali. Scegliere il canale desiderato e cliccare su "Add" (Aggiungi).

“Edit...”
(Modifica...):

Si visualizza così una finestra in cui si può impostare il “Target Sample Range”. Il “Target Sample Range” è il range di fluorescenza iniziale da impostare per il campione nella provetta specificata. “Auto-Gain Optimisation” legge ogni canale utilizzando le impostazioni di gain specificate da “Acceptable Gain Range” (Range gain accettabile). Sceglie la prima impostazione del gain che dà un valore della fluorescenza entro il “Target Sample Range”. Nell'esempio mostrato, “Auto-Gain Optimisation” ricerca un'impostazione del gain tra -10 e 10 che dia un valore tra 5 e 10 FI nella provetta 1. In generale, per i coloranti intercalanti è appropriato un “Target Sample Range” di 1–3 FI, mentre un range di 5-10 FI è più adatto ai prodotti chimici per sonda.



“Remove/
Remove All”
(Elimina/
Elimina tutto):

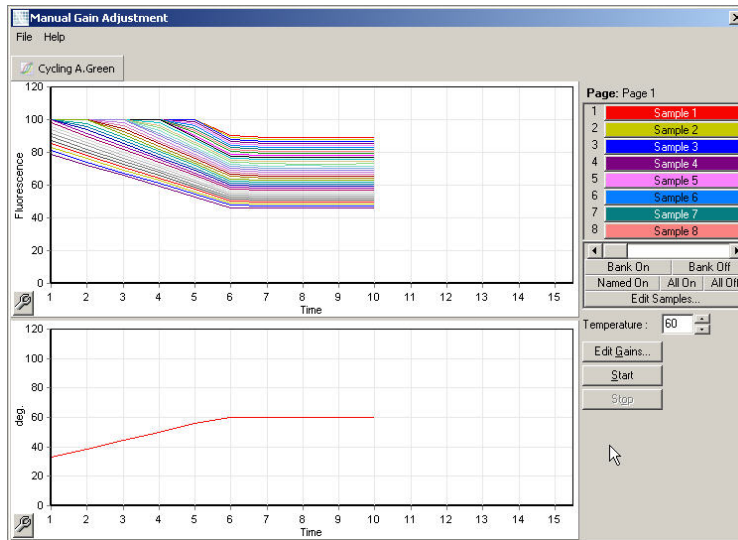
“Remove” elimina il canale evidenziato.
“Remove All” elimina tutti i canali.

“Start”:	“Start” inizia la “Gain Optimisation”. Viene selezionato un gain in grado di dare livelli del segnale di fluorescenza entro il range specificato. Se la fluorescenza cade al di fuori del range specificato, il gain viene impostato per dare la massima corrispondenza possibile.
“Manual” (Manuale):	Apri la finestra “Manual Gain Adjustment” (Regolazione manuale gain) (vedere pag. 6-29).
“Changing Gain During a Run” (Cambia gain durante un processo):	Se un gain era troppo alto o troppo basso all'inizio di un processo, può essere cambiato durante i primi dieci cicli. Nel punto in cui il gain è stato cambiato, viene visualizzata una linea verticale. I cicli prima del cambiamento sono esclusi dall'analisi.

Nota: “Gain Optimisation” può selezionare un'impostazione che non rientra nel range specificato. Questo può essere dovuto a cambiamenti nella fluorescenza dopo la prima fase di sosta. Il risultato di “Gain Optimisation” fornisce tuttavia una buona indicazione del livello di fluorescenza da cui partirà il processo.

“Manual Gain Adjustment”

Per eseguire “Manual Gain Adjustment”, cliccare su “Manual...” nella finestra “Auto-Gain Optimisation Setup”. Viene visualizzata la finestra “Manual Gain Adjustment”. Questa finestra indica i valori della fluorescenza per ogni data temperatura in tempo reale. Si usa quando il background di un campione è sconosciuto e quindi si deve determinare il gain per garantire che il segnale del campione sia sufficiente per il rilevamento.



Per default, tutti i campioni sono visualizzati sul display. I campioni possono essere eliminati o aggiunti al display mediante il toggler a destra. Il toggler è composto da celle colorate, ognuna corrispondente a un campione visualizzato. I campioni nelle celle a colori brillanti sono visualizzati, mentre i campioni nelle celle a colori sbiaditi non sono visualizzati. I campioni possono essere visualizzati o no cliccando sulla cella oppure trascinando il puntatore del mouse su diverse celle contemporaneamente.

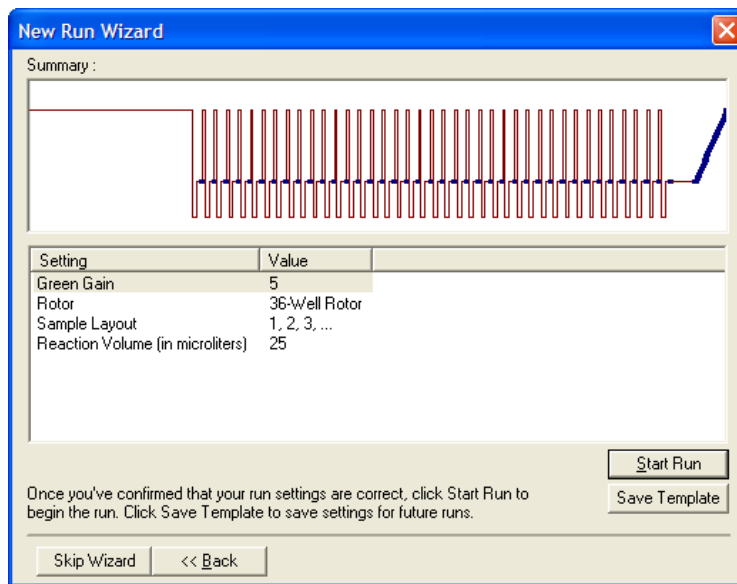
Consigliamo di eseguire il “Manual Gain Adjustment” come segue.

1. Regolare la temperatura nella finestra “Manual Gain Adjustment” sulla temperatura di acquisizione richiesta per il processo.
Nota: La temperatura non può essere regolata mentre il Rotor-Gene Q MDx è in funzione. Riavviare il Rotor-Gene Q MDx per applicare le modifiche alla temperatura.
2. Cliccare su “Start”. Il processo ha inizio. La temperatura del Rotor-Gene Q MDx viene regolata sulla temperatura specificata nella finestra. I grafici nella finestra cominciano a visualizzare i dati.

3. Attendere che la temperatura si stabilizzi.
4. Notare il valore della fluorescenza (FI) nel punto finale.
5. Se il valore FI non è al livello richiesto, cliccare su "Edit Gains..." (Modifica gain) e modificare come necessario. Questo processo potrebbe non essere istantaneo, in quanto il Rotor-Gene Q MDx richiede 4 secondi circa per acquisire ogni punto di ogni canale e nel frattempo l'interfaccia utente è disattivata.
6. Ripetere il processo fino ad avere FI al livello desiderato.
7. Cliccare su "Stop". Se il processo sta ancora acquisendo dati quando si clicca su "Stop", il Rotor-Gene Q MDx prima termina l'acquisizione, poi si arresta. Questo processo può richiedere fino a 5 secondi per ogni canale di acquisizione.

6.2.5 Finestra “New Run Wizard” 4

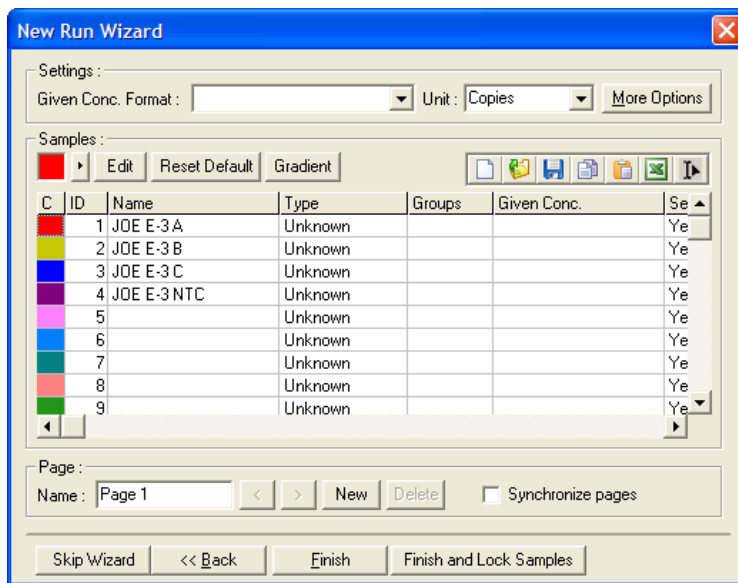
Questa finestra riepiloga il processo. Controllare i parametri e, se sono corretti, cliccare su “Start Run”. Sarà richiesto il nome di un file. Si possono anche salvare le impostazioni del processo come modello per cicli futuri con il pulsante “Save Template”.



6.2.6 Finestra “New Run Wizard” 5

Immettere in questa finestra il tipo e la descrizione dei campioni mentre il processo è in corso. Le funzioni di questa finestra sono identiche a quelle della finestra “Edit Samples” (pag. 7-80). Si possono immettere informazioni sui campioni anche dopo che il processo è terminato.

Il pulsante “Finish and Lock Samples” (Termina e blocca campioni) chiude la schermata e impedisce di modificare il nome dei campioni. Per ulteriori informazioni su questa e altre caratteristiche, vedere il menu Sicurezza (page 7-91).



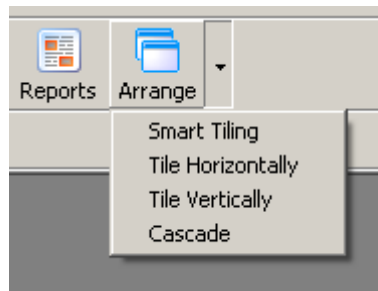
Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

7 Interfaccia utente analisi

Questo capitolo descrive l'interfaccia utente del software Rotor-Gene Q.

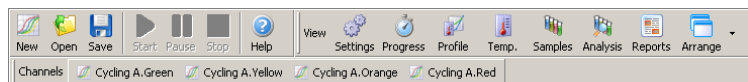
7.1 Spazio di lavoro

Lo spazio di lavoro è lo sfondo della finestra principale. In questa area si possono aprire grafici dei dati grezzi e risultati di analisi. Se si aprono più finestre contemporaneamente, è possibile organizzarle cliccando sul pulsante "Arrange" (Disponi) sulla barra degli strumenti. Per la disposizione delle finestre, sono disponibili diverse opzioni che possono essere selezionate cliccando sulla freccia verso il basso accanto al pulsante "Arrange".



7.2 Barra degli strumenti

Questi pulsanti sono scorciatoie per le operazioni più usate. Si può accedere a queste operazioni anche dai menu a tendina.



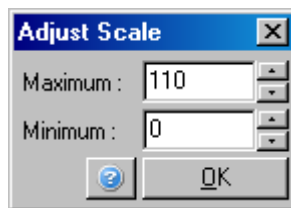
7.3 Visualizza canali dati grezzi

Cliccare su questi pulsanti per visualizzare i dati grezzi (non analizzati) di particolari canali nel processo.



Quando si visualizzano questi dati sono disponibili varie opzioni per modificare la loro presentazione. I dati grezzi possono anche essere trasformati per facilitare diversi tipi di analisi.

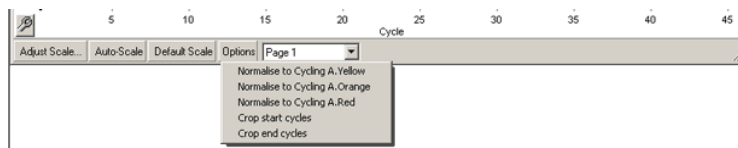
“Adjust Scale”
(Definizione scala): Per selezionare “Adjust Scale”, cliccare con il tasto destro del mouse sulla finestra appropriata. “Adjust Scale” apre una finestra in cui si può specificare una scala.



“Autoscale”: “Autoscale” tenta di adattare la scala ai valori massimi e minimi dei dati.

“Default Scale”
(Scala di default): “Default Scale” resetta la scala di visualizzazione da 0 a 100 unità di fluorescenza.

Icona chiave inglese: Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.5.



“Options”
(Opzioni): Visualizza il menu a tendina mostrato sopra, che propone le opzioni per la trasformazione dei dati grezzi.

“Normalise to ...” (Normalizza a):	Consente di normalizzare i dati di amplificazione in dati ottenuti da un colorante di riferimento passivo, per es. ROX, acquisiti in un altro canale.
“Crop start cycles” (Elimina cicli iniziali):	Si crea una nuova serie di dati del canale da cui sono stati rimossi alcuni dei cicli iniziali. È utile se si osservano salti notevoli nei cicli iniziali, cosa che può accadere quando si usano certe sostanze chimiche.
“Crop end cycles” (Elimina cicli finali):	Si crea una nuova serie di dati del canale da cui sono stati rimossi alcuni dei cicli finali.
“Page 1” (Pagina 1):	Indica la pagina selezionata attualmente per visualizzare i grafici dei dati grezzi. La finestra “Edit Sample” permette di creare definizioni multiple del campione. Per esempio, si possono visualizzare dati variando lo spessore della linea, le definizioni del campione e altre opzioni di visualizzazione. Questo è particolarmente utile se si esegue la quantificazione relativa in un singolo canale, perchè l'utente può facilmente cambiare visualizzazione tra il gene che interessa e i campioni housekeeping mediante la definizione di 2 pagine campione.

7.4 Passaggio da un campione all'altro

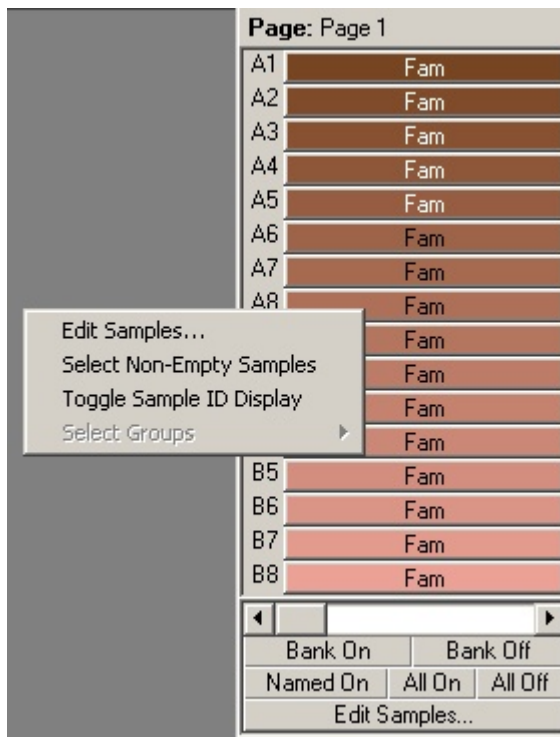
Sul lato destro della finestra principale è presente un toggler con una legenda dei campioni. Il toggler è formato da celle colorate, ognuna corrispondente a un campione visualizzato. Il toggler è usato per controllare quali campioni sono visibili sul display. I campioni nelle celle a colori brillanti sono visualizzati, mentre i campioni nelle celle a colori sbiaditi

non sono visualizzati. I campioni possono essere visualizzati o no cliccando sulla cella oppure trascinando il puntatore del mouse su diverse celle contemporaneamente. I pulsanti "Bank On" e "Bank Off" nascondono o visualizzano rispettivamente tutti i campioni visibili correntemente nell'elenco. La barra di scorrimento può essere usata per visualizzare il gruppo successivo di campioni.

Nota: Il numero di campioni visualizzato è dinamico e dipende dallo spazio disponibile nella finestra.

Cliccando "Named On" (File con nome) si visualizzano solo i campioni a cui è stato dato un nome. È un modo rapido per mostrare solo campioni rilevanti. Cliccando su "All On" (Tutti i campioni) o "All Off" (Nessun campione) si visualizzano rispettivamente tutti i campioni nel rotore o nessuno. Con il pulsante "Edit Samples..." si apre la finestra relativa in cui si possono modificare nome e tipo dei campioni e le concentrazioni standard (vedere Sezione 7.8.4).

Il toggler è illustrato sotto. Le opzioni aggiuntive vengono visualizzate cliccando con il pulsante destro del mouse sul toggler.



“Page” (Pagina):

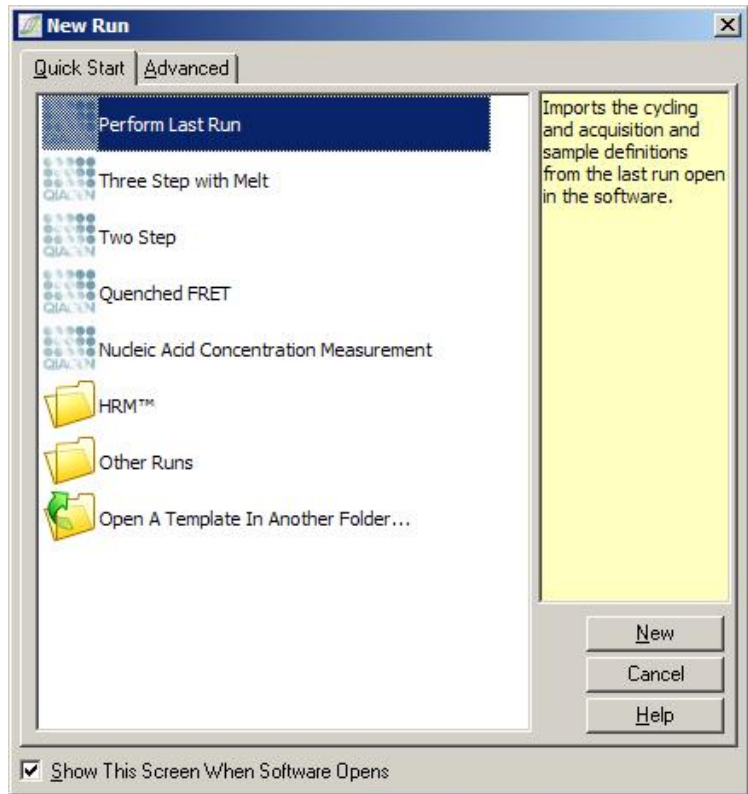
Questa etichetta in alto sul toggler indica la pagina del campione che è visualizzata. Le pagine permettono analisi indipendenti variate partendo dal set di dati di un unico canale. Per esempio, si possono eseguire due curve standard nel canale verde e generare report indipendenti. Ulteriori informazioni su come impostare le pagine campioni sono disponibili nella Sezione 7.8.4.

"Toggle Sample ID Display" (Alternanza visualizzazione ID campioni):	Se si utilizza un rotore a 72 pozzetti, i campioni sono mostrati nel formato da A1 ad A8, da B1 a B8, ecc. L'opzione "Toggle Sample ID Display" permette all'utente di passare all'ordinamento numerico dei campioni (da 1 a 72).
"Select Non-Empty Samples" (Selezionare campioni non vuoti):	Questa opzione deseleziona tutti i campioni per cui è specificato come "Type" (Tipo) "None" (Nessuno) nella finestra "Edit Samples". Questo garantisce che siano visualizzati solo i campioni pertinenti per l'analisi.
"Select Groups" (Selezionare gruppi):	Se sono stati definiti dei gruppi, con questa opzione si alterna (attivazione/disattivazione) la visualizzazione dei campioni nei gruppi. I gruppi sono raccolte arbitrarie di campioni che consentono report avanzati dei risultati statistici. Per esempio, si possono definire gruppi di campioni dei pazienti trattati e non trattati. I gruppi possono essere impostati nella finestra "Edit Samples".

7.5 Menu file

7.5.1 "New"

Dopo aver selezionato "File" e poi "New" (Nuovo), viene visualizzata la finestra "New Run". Questa finestra presenta i modelli di uso più comune organizzati sotto le schede "Quick Start" e "Advanced". Una volta scelto il modello, la procedura guidata aiuta ad impostare il processo e permette di modificare le impostazioni e i profili.



Per informazioni sui modelli forniti, vedere la Sezione 6.1 e la Sezione 6.2.

“New Run”:

“New... ” (Nuovo): Avvia l'impostazione del processo servendosi del modello selezionato.

“Cancel” (Annulla): Chiude questa finestra.

“Help” (Guida): Apre la guida online.

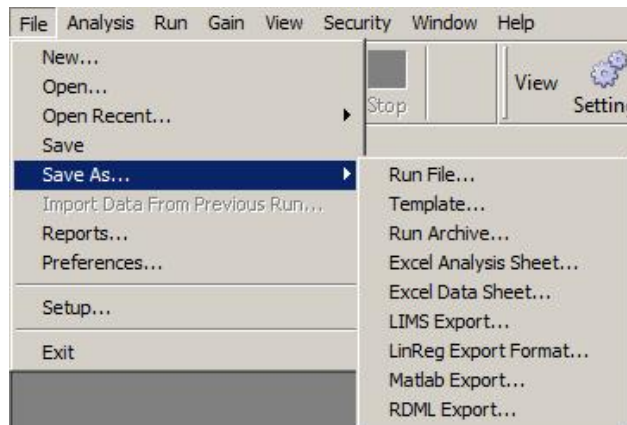
"Show This Screen When Software Opens"
(Mostra questa schermata all'apertura del software):
Selezionando questa casella, viene visualizzata la finestra "New Run" quando si avvia il software.

7.5.2 "Open" e "Save"

"Open..."
(Apri):
Apre un file di processo Rotor-Gene Q salvato in precedenza (*.rex) o un archivio dei processi Rotor-Gene Q (file *.rea).

"Open Recent..."
(Apri file recente):
Visualizza gli ultimi 4 file che sono stati aperti e salvati.

"Save"
(Salva):
Salva tutte le modifiche apportate a un file di processo.



“Save As...”:	Usare questa funzione per salvare il file o i dati del processo in vari formati. Le opzioni sono elencate di seguito.
“Run File...” (File processo):	Salva una copia del file. L'utente può cambiare il nome e la destinazione del salvataggio. Questo è il formato di default.
“Template...” (Modello):	Salva il setup del profilo e delle impostazioni associate, ma non i dati del processo. Il modello può essere utilizzato per avviare futuri processi.
“Run Archive...” (Archivio processi):	Salva il file in un formato più compatto. Salvare i file in questo formato prima di spedirli per e-mail. Si riduce così il tempo necessario all'invio e si garantisce che i file non siano alterati dai client dell'e-mail.
“LIMS Export” (Esportazione LIMS):	Salva l'analisi in formati LIMS compatibili secondo le esigenze dell'utente. Contattare l'assistenza tecnica QIAGEN per maggiori informazioni.
“Excel Data Sheet...” (Foglio dati Excel):	Esporta tutti i canali dati grezzi in un foglio Excel®. Solo i campioni selezionati vengono esportati.
“Excel Analysis Sheet...” (Foglio analisi Excel):	Esporta tutte le analisi del processo corrente in un unico foglio Excel.
“LinReg Export Format...” (Formato esportazione LinReg):	Esporta tutti i dati grezzi del canale in un formato che può essere letto da LinReg (uno strumento di analisi dell'efficienza). Vedere il seguente paragrafo “Exporting To LinReg” (Esportazione in LinReg) per maggiori informazioni.

- “Matlab Export...” (Esportazione in Matlab): Esporta i dati in un formato che può essere letto dal pacchetto scientifico Matlab (o da Octave, suo equivalente open-source). Può essere utile per la ricerca dei metodi.
- RDML Export : (Esportazione in RDML): Esegue un'esportazione del file conforme a RDML v1.1. Il file di esportazione RDML creato è un file nel formato XML compresso (ZIP), con estensione ***.rdml**, ed è conforme al documento dello schema RDML (http://www.rdml.org/RDML_v1_1_PR.xsd) fornito sul sito web <http://www.rdml.org/files.php>.

Esportazione in LinReg

LinReg è uno strumento sviluppato da C. Ramakers e collaboratori.* Lo strumento LinReg è disponibile in: <http://LinRegPCR.nl>.

Il software Rotor-Gene Q permette all'utente di esportare dati grezzi in un formato che può essere importato dallo strumento LinReg per l'analisi.

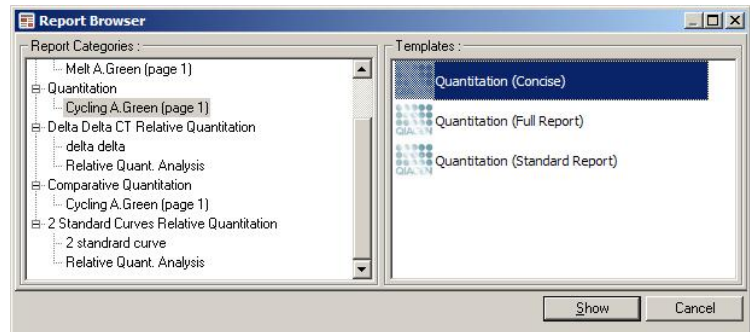
1. Aprire il file di processo Rotor-Gene Q contenente i dati grezzi.
2. Esportare i dati nel formato di esportazione LinReg selezionando “Save As...” e poi “LinReg Export Format...”.
3. Microsoft Excel visualizza automaticamente i dati grezzi esportati.
4. Lanciare lo strumento LinReg.
Lo strumento chiede di selezionare il range di celle in cui si trovano i dati grezzi. Lo strumento può analizzare un

* Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative (PCR) data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e45.

solo canale alla volta, quindi si deve selezionare un'area appropriata del foglio Excel.

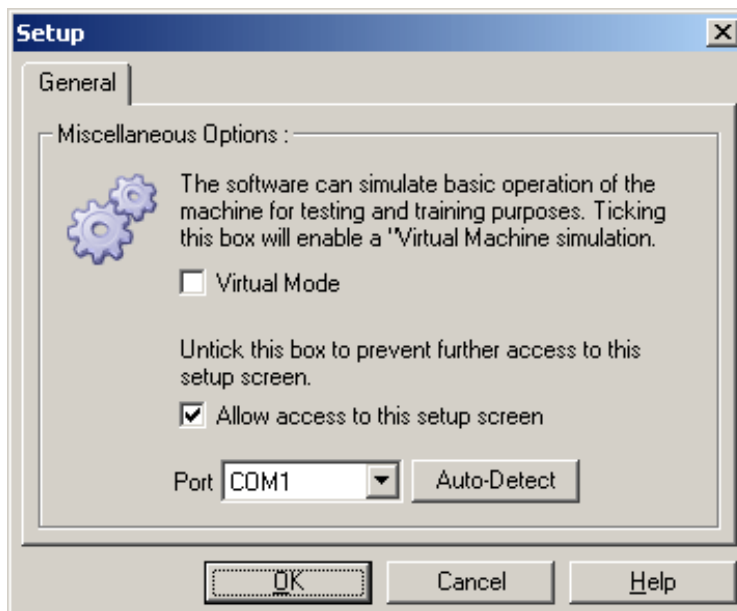
7.5.3 Report

Dopo aver selezionato "Reports" (Report), viene visualizzata la finestra "Report Browser" (Browser Report). Se i dati sono stati già analizzati, il report dell'analisi può essere visualizzato dalla finestra "Report Browser". Sono disponibili vari tipi di report con vari gradi di completezza di dettagli.



7.5.4 Setup

Il setup iniziale di Rotor-Gene Q MDx dovrebbe essere completato durante l'installazione. Questa opzione tuttavia permette, se lo si desidera, di modificare il setup di connessione del Rotor-Gene Q MDx anche dopo l'installazione.



“Virtual Mode”: Selezionare questa opzione se il software sarà utilizzato senza connessione ad un Rotor-Gene Q MDx. Il software mantiene tutte le funzioni. Questa modalità è utile a fini dimostrativi, per l'analisi dei dati e l'impostazione di modelli.

“Allow access to this setup screen” (Permetti accesso a questa schermata): Se questa opzione non viene selezionata durante il setup, questa finestra non è più accessibile. Questa misura di sicurezza impedisce agli utenti di cambiare le impostazioni. Per riottenere l'accesso, rivolgersi al distributore locale.

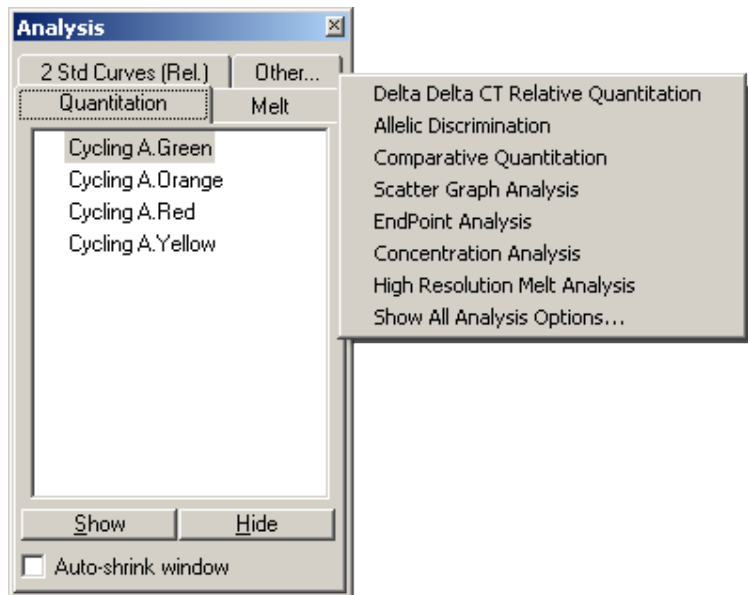
“Port”: Selezionare la porta corretta per consentire la comunicazione tra il computer e il Rotor-Gene Q MDx.

“Auto-Detect”: Se non si è sicuri di quale porta selezionare, cliccare su “Auto-Detect” per ricercare tutte le porte disponibili.

7.6 Menu analisi

7.6.1 Analisi

Dopo aver cliccato su "Analysis" (Analisi), viene visualizzata la finestra relativa. Questa finestra consente la creazione di nuove analisi e la visualizzazione di analisi esistenti. Servirsi delle schede per selezionare il metodo di analisi. È mostrata una lista dei canali che possono essere analizzati con il metodo scelto. Si possono eseguire più sedute di analisi indipendenti nello stesso canale, purché siano state impostate come pagine separate nella finestra "Edit Samples". Le pagine già analizzate sono contrassegnate da un segno di spunta verde. Questo significa che per questa analisi sono state salvate le impostazioni di soglia e normalizzazione. Fare doppio clic sul canale da visualizzare o analizzare. Apparirà la finestra analisi specifica.

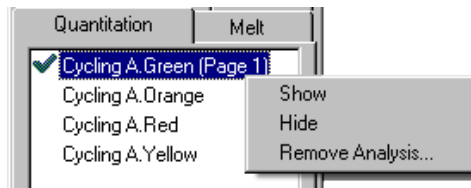


“Auto-shrink window”
(Ridimensionamento automatico):

Selezionando “Auto-shrink window” la finestra si ridimensiona quando non è utilizzata. Muovere il cursore sulla finestra per ingrandirla nuovamente.

Organizzazione dello spazio di lavoro

Ogni volta che si lancia una nuova analisi, le sue finestre si dispongono in modo da adattarsi a quelle già presenti nella schermata. Questo può risultare scomodo se sono aperte molte finestre. Chiudere le finestre superflue, quindi cliccare su “Arrange” sulla barra degli strumenti. Le finestre si disporranno automaticamente secondo il metodo “Smart Tiling” (Disposizione intelligente). In alternativa, scegliere un altro metodo cliccando sulla freccia accanto al pulsante “Arrange”. Si hanno a disposizione altre opzioni anche cliccando con il tasto destro sul nome dell'analisi.



“Show”
(Mostra):

Visualizza l'analisi selezionata.

“Hide”
(Nascondi):

Nasconde l'analisi selezionata.

“Remove
Analysis...”:
(Elimina analisi)

Elimina completamente l'analisi selezionata. Questo significa che andranno perdute tutte le impostazioni di normalizzazione o i setup dei bin di fusione.

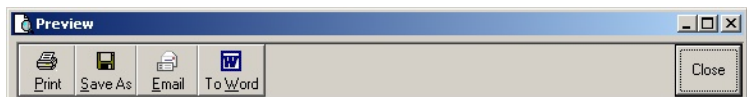
7.6.2 Quantificazione

Selezionare la scheda "Quantitation" (Quantificazione) nella finestra "Analysis", poi fare doppio clic sul nome del canale o selezionare il canale e poi premere il pulsante "Show" per aprire il canale desiderato. Sono visualizzate tre finestre: la schermata principale, la curva standard e i risultati.

Report

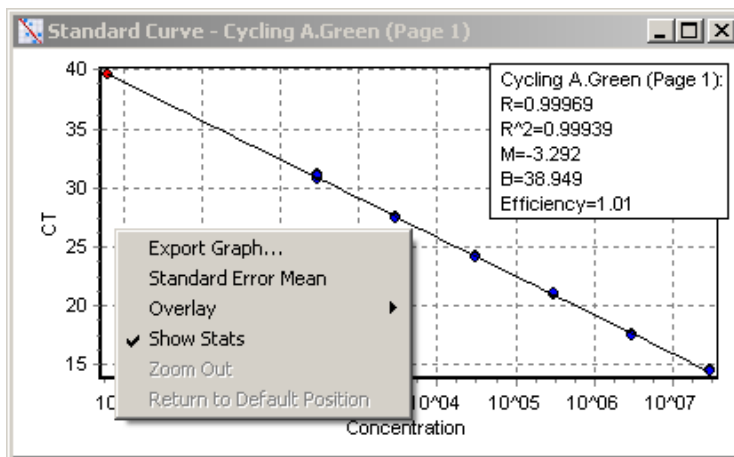
"Reports": "Reports" apre la finestra "Report Browser" dove si può generare un report dell'analisi corrente. Le opzioni disponibili sono 3: report standard, report completo e report conciso. Cliccare due volte sull'opzione desiderata per aprire il report nella finestra "Preview" (Anteprima).

Una volta generato il report, si possono usare i pulsanti in alto nella finestra "Preview" per stampare, salvare o inviare un report per e-mail oppure esportarlo in Word.



Curva standard

"Std. Curve": Questo pulsante apre la finestra "Standard Curve" (Curva standard). Per default, si apre questa finestra quando si apre un'analisi. Se si chiude la finestra, utilizzare questo comando per riapirla.



I valori sulla curva standard sono ricalcolati dinamicamente se si varia il livello di soglia cliccando sulla linea di soglia e trascinandola nella finestra principale.

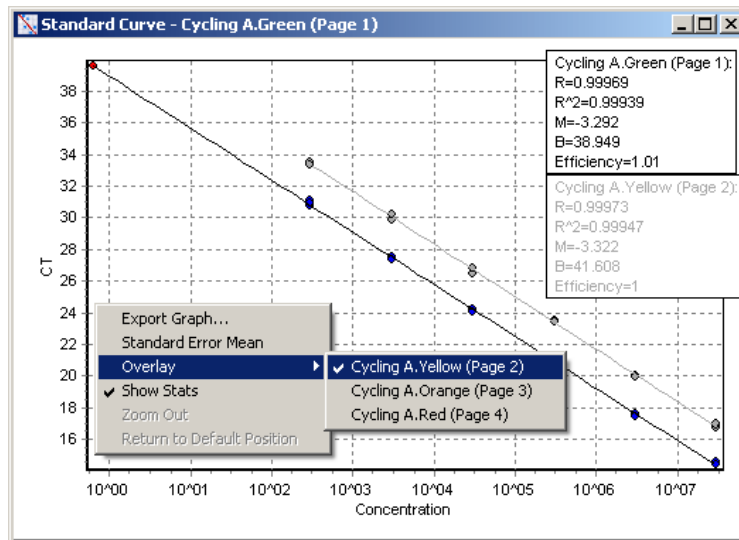
I puntini blu sulla curva rappresentano i campioni definiti come standard, mentre quelli rossi rappresentano i punti dati sconosciuti del campione.

Nota: Se si ridefiniscono gli standard per ricalcolare la curva standard, escludendo la visibilità del campione standard mediante il toggler sulla destra dello schermo si rimuove il campione dal calcolo della curva standard. La rimozione degli standard dal grafico per aumentare il valore R^2 non ha valore scientifico. Uno standard errato può essere indicazione di errore anche per i campioni e quindi dovrebbe essere incluso nei risultati.

"Efficiency" (Efficienza):	È l'efficienza di reazione del processo. Questo valore è trattato più dettagliatamente a pag. 7-33.
Valore " R^2 " (coefficiente di correlazione):	<p>Il valore R^2, o valore R^2, è la percentuale dei dati coerente con l'ipotesi che gli standard formino una curva standard. Se il valore R^2 è basso, gli standard non corrispondono facilmente con una linea ottimale. Questo significa che i risultati (ossia le concentrazioni calcolate) potrebbero non essere affidabili. Un valore valido R^2 è all'incirca di 0,999.</p> <p>Nota: È possibile ottenere un valore R^2 alto con una curva standard non valida se si è usato un numero insufficiente di standard. Il valore R^2 migliora diminuendo il numero degli standard. Per un'indicazione più precisa dell'affidabilità dei risultati, usare come guida l'intervallo di confidenza sulle concentrazioni calcolate.</p>
Valore "R" (radice quadrata del coefficiente di correlazione):	Il valore R è la radice quadrata del valore R^2 . In generale, il valore R^2 è più utile per determinare la correlazione.
"M" e "B":	La pendenza (M) e l'intercetta (B) della curva standard possono essere calcolate automaticamente con la formula $y = Mx + B$, e visualizzate nella finestra "Standard Curve".
"Export Graph..." (Esporta grafico):	Cliccando con il tasto destro del mouse sulla curva standard si visualizza l'opzione di esportazione del grafico (vedere Sezione 8.4).

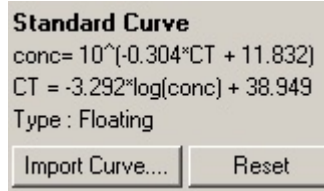
“Overlay”
(Sovrapposizione):

Se si sono eseguite più analisi quantitative nello stesso processo, è possibile sovrapporre le curva standard nella stessa finestra. Questo è utile per visualizzare graficamente la differenza tra le diverse soglie. Tale caratteristica è mostrata nella schermata sottostante.



Calcolo della curva standard

“ $\text{conc} = \dots * C_T + \dots$ ” e “ $C_T = \dots$ ” sono 2 versioni dell'equazione utilizzata per mettere in rapporto i valori C_T e le concentrazioni. Nelle pubblicazioni, la formula maggiormente usata è “ $C_T = \dots$ ”. La curva standard può essere o “Floating” (fluttuante) o “Fixed” (fissa). Se “Floating”, viene calcolata un'equazione ottimale per la curva standard ogni volta che la soglia viene spostata nella finestra principale. Se “Fixed”, l'equazione non cambia perchè è stata importata da un altro processo.



Importazione curva

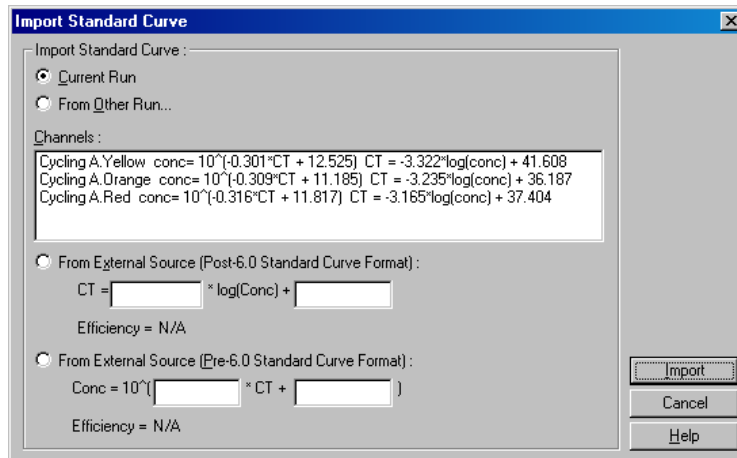
L'importazione di una curva standard permette la stima delle concentrazioni quando in un processo particolare non è disponibile una curva standard e l'efficienza della reazione non è cambiata tra 2 processi. Le curve possono essere importate da un altro canale o da un altro processo cliccando su "Import Curve" (Importa curva).

Se necessario, si può aggiustare la curva standard. L'aggiustamento significa che si importa nel processo corrente solo l'efficienza della curva standard sorgente. Dipende dalle sostanze chimiche usate se si debba aggiustare o no la curva standard.

Per aggiustare la curva standard, usare nel nuovo processo un riferimento di concentrazione nota. Definire un riferimento impostando il tipo di campione su "Standard" e immettendo un valore di concentrazione nella finestra "Edit Samples". Per migliorare la precisione si possono immettere copie multiple dello stesso riferimento. Tenere presente che non è possibile definire più di una concentrazione o uno standard di riferimento. Per esempio, è possibile avere 3 riferimenti replicati di 1000 copie, ma non è possibile avere un riferimento di 1000 copie e un altro di 100 copie nello stesso processo.

Una volta importata la curva standard, il tipo di quest'ultima passa a "Fixed". Cliccare su "Reset" per riportare a "Floating" il tipo di curva standard.

Sotto è illustrata una schermata della finestra "Import Standard Curve" (Importa curva standard).



Utilizzando questa finestra, si può importare una curva standard per un altro canale analizzato nel processo corrente o da un altro processo.

“Current Run” (Processo corrente): Quando è selezionata questa opzione, le analisi di quantificazione su altri canali ottenute con questo processo sono elencate con le curve standard corrispondenti.

“From Other Run...” (Da un altro processo): Selezionando questa opzione, si apre una finestra di dialogo da cui si può selezionare un file di processo da aprire. Se per il processo è stata eseguita un'analisi quantitativa, sono elencate le curve standard per ogni canale analizzato.

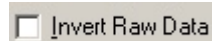
Nota: Le impostazioni dell'analisi quantitativa devono essere state salvate nel file.

“Channels”: Vi sono elencati i canali analizzati e le rispettive formule di curva standard.

"From External Source"
(Da fonte esterna): In quest'area, si possono immettere direttamente i valori M e B. Questa funzione è utile nei casi in cui i valori provengono da una fonte esterna per es. un foglio di lavoro Excel.

Calcolo di C_T

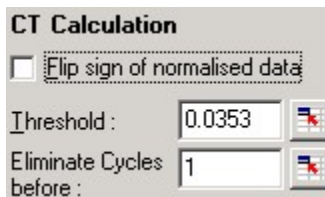
"Invert raw data"
(Invertire dati grezzi): Alcune sostanze chimiche producono un segnale fluorescente che diminuisce in misura esponenziale invece che aumentare. È possibile analizzare questi dati con "Quantitation", ma in questo caso deve essere selezionata la casella "Invert Raw Data". Per tutte le altre analisi quantitative, questa opzione non deve essere selezionata.



" C_T Calculation"
(Calcolo di C_T): Il valore C_T è il numero di ciclo nel punto in cui la curva di amplificazione attraversa una soglia di rilevamento. Impostando una linea di soglia e calcolando l'intersezione con ciascuna curva, si stabilisce il valore di C_T per ogni campione.

“Threshold”
(Soglia):

Per impostare la soglia, cliccare sull'icona (griglia con freccia rossa), poi cliccare sul grafico e trascinare la linea sul livello desiderato. In alternativa, immettere un valore logaritmico. In alternativa, si può usare “Auto-Find Threshold” (Trova soglia automaticamente) per determinare automaticamente la soglia. Quando si imposta manualmente la soglia, è consigliabile farlo nella fase esponenziale del processo, significativamente al di sopra del livello di background per evitare il rumore e sotto l'inizio del plateau del segnale nei cicli successivi.



CT Calculation

Flip sign of normalised data

Threshold : 0.0353

Eliminate Cycles before : 1

“Eliminate Cycles before” (Elimina cicli prima di): Per impostare la soglia, cliccare sull'icona (griglia con freccia rossa), poi cliccare sul grafico e trascinare la linea verso destra. Si elimina così la soglia per i numeri di ciclo bassi.

Nota: Questo è utile se c'è rumore durante i cicli iniziali, per es. a causa di effetti di miscelazione del campione.

“Auto-Find Threshold”:

Questa funzione esplora la regione selezionata del grafico per trovare un'impostazione della soglia che dia stime ottimali di date concentrazioni. La regione selezionata può essere cambiata immettendo nuovi limiti superiori e inferiori nelle caselle di testo visualizzate.

Per la maggior parte delle analisi, sono sufficienti i limiti superiori e inferiori di default. Il range dei livelli di soglia viene esplorato per ottenere la migliore corrispondenza della curva standard sulla base dei campioni che sono stati definiti come standard (cioè in cui il valore R è più prossimo a 1,0).



Risultati

Apri la finestra “Quantitation Results”. Per default, si apre questa finestra quando si apre un'analisi. Se la finestra è stata chiusa, utilizzare questo comando per riaprirla.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)														
Analyte	No.	Colour	Name	Type	Cl	Cl Comment	Given Conc	Calc Conc (c)	S:Var	Rep. Cl	Rep. Cl Std	Rep. Cl (95% Cl)	Rep. Calc Conc	Rep. Calc Conc (95% Cl)
Cycling A.Green (Page 1) 1	1	10e9	Standard				3.73	1.00E+08	7.19E+07	28.1%				
Cycling A.Green (Page 1) 2	2	10e8	Standard				3.74	1.00E+08	7.17E+07	28.3%				
Cycling A.Green (Page 1) 3	3	10e8	Standard				3.74	1.00E+08	7.16E+07	28.4%				
Cycling A.Green (Page 1) 4	4	10e7	Standard				6.11	1.00E+07	1.44E+07	44.0%	6.0E	0.0E (5.91, 6.21)	1.49E+07	(3.29E+06, 6.73E+07)
Cycling A.Green (Page 1) 5	5	10e7	Standard				6.08	1.00E+07	1.47E+07	46.6%				
Cycling A.Green (Page 1) 6	6	10e7	Standard				5.89	1.00E+07	1.50E+07	55.9%				
Cycling A.Green (Page 1) 7	7	10e5	Standard				10.43	1.00E+05	7.72E+05	22.9%				
Cycling A.Green (Page 1) 8	8	10e6	Standard				10.27	1.00E+06	8.58E+05	14.2%	10.30	0.03 (10.15, 10.60)	0.00E+05	(2.62E+05, 2.44E+06)
Cycling A.Green (Page 1) 9	9	10e6	Standard				10.43	1.00E+06	7.71E+05	22.9%				
Cycling A.Green (Page 1) 10	10	10e5	Standard				13.45	1.00E+05	8.65E+04	3.2%	13.65	0.13 (13.31, 13.98)	8.74E+04	(2.96E+04, 2.59E+05)
Cycling A.Green (Page 1) 11	11	10e5	Standard				13.25	1.00E+05	8.13E+04	18.7%				
Cycling A.Green (Page 1) 12	12	10e5	Standard				13.63	1.00E+05	8.40E+04	15.2%				
Cycling A.Green (Page 1) 13	13	10e4	Standard				15.66	1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25 (14.84, 16.08)	2.56E+04	(7.82E+03, 8.26E+04)
Cycling A.Green (Page 1) 14	14	10e4	Standard				15.54	1.00E+04	2.42E+04	141.7%				
Cycling A.Green (Page 1) 15	15	10e4	Standard				15.18	1.00E+04	3.09E+04	208.8%				
Cycling A.Green (Page 1) 16	16	10e3	Standard				21.36	1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24 (20.49, 21.69)	5.69E+02	(9.13E+01, 3.50E+03)
Cycling A.Green (Page 1) 17	17	10e3	Standard				20.85	1.00E+03	6.47E+02	35.3%				
Cycling A.Green (Page 1) 18	18	10e3	Standard				21.02	1.00E+03	5.94E+02	40.6%				
Cycling A.Green (Page 1) 19	19	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)		1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1) 20	20	10e2	Standard				23.90	1.00E+02	7.99E+01	20.1%				
Cycling A.Green (Page 1) 21	21	10e2	Standard			NEG (Multi Cl)		1.00E+02						
Cycling A.Green (Page 1) 22	22	NTC	NTC			NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1) 23	23	NTC	NTC			NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1) 24	24	NTC	NTC			NEG (NTC)								

Nella finestra “Quantitation Results”, i risultati del processo sono riepilogati in una tabella. Utilizzando il tasto destro del mouse e selezionando “Export to Excel” (Esporta in Excel) si esporta la tabella in Excel. Excel si apre automaticamente.

Per copiare i dati in un foglio di lavoro esistente, selezionare invece l'opzione "Copy" (Copia), aprire il foglio di lavoro e selezionare "Paste" (Incolla).

La finestra "Quantitation Results" include le seguenti colonne.

"Analysis"	Il set di dati corrente (canale di acquisizione e pagina campione).
"No."	Il numero del campione.
"Color" (Colore)	Il colore di grafico definito per il singolo campione.
"Type" (Tipo)	Il tipo definito del campione.
"C _T "	Il valore C _T determinato.

<p>“Ct Comment” (Commento Ct)</p>	<p>Annotazione automatica della determinazione di C_T se sono esclusi i valori C_T. Sono possibili i seguenti flag:</p> <p>NEG (Multi Ct): la soglia interseca la curva di fluorescenza almeno due volte (doppia intersezione). Non è possibile determinare un valore C_T inequivocabile.</p> <p>NEG (NTC): l'aumento complessivo della fluorescenza non soddisfa le condizioni definite nella funzione “NTC threshold” (Soglia NTC) del menu “Outlier Removal” (Rimozione valori estremi) (vedere sotto). Per esempio, una curva di fluorescenza interseca la soglia data, ma il generale minor aumento della pendenza suggerisce un controllo non-template e non viene dato un valore C_T.</p> <p>NEG (R.Eff): l'aumento complessivo della fluorescenza non soddisfa le condizioni definite nella funzione “Reaction efficiency threshold” (Soglia efficienza di reazione) del menu “Outlier Removal” (vedere sotto). Sono esclusi i campioni che non hanno una certa efficienza di reazione e non viene dato un valore C_T. Questo flag è visualizzato solo se la funzione corrispondente è abilitata.</p>
<p>“%Var”:</p>	<p>la variazione percentuale tra la concentrazione calcolata e quella nota. $\%Var = \text{Abs}(\text{calcolata}/\text{data} - 1)$</p>
<p>“Rep. Ct”:</p>	<p>il C_T medio di tutti i campioni con lo stesso nome di questo campione.</p>
<p>“Rep. Ct Std. Dev.”:</p>	<p>la deviazione standard del valore C_T di tutti i campioni con lo stesso nome di questo campione.</p>

“Rep. Ct 95% C.I.”: un range di C_T che statisticamente risponde del 95% di variazione del valore C_T . Si tratta di una misura statistica conservativa che può essere usata come misura della qualità. Questo range può essere ristretto analizzando più replicati o con una variazione minore nei replicati.

“Rep. Calc. Conc”:

la concentrazione calcolata per tutti i campioni con lo stesso nome.

Nota: Questa non è una semplice media delle concentrazioni calcolate. Si tratta invece di una media geometrica, che è una media matematicamente più idonea a causa della natura esponenziale dell'amplificazione in tempo reale.

“Rep. Calc. Conc. 95% C.I.”: un range di concentrazioni che risponde del 95% della variazione del campione individuale e del modello di regressione lineare su cui è basato. Un'interpretazione di questa misura è di considerarla come il range delle concentrazioni che si otterrebbero il 95% delle volte se questo processo fosse ripetuto più volte con la stessa quantità di variazione. Si tratta di una stima conservativa e il range può essere anche molto ampio a causa della variazione intrinseca di ogni analisi in tempo reale. Questo range può essere ampio se gli standard sono analizzati con concentrazioni diverse dai campioni sconosciuti, se si utilizza un piccolo numero di replicati o se c'è una variazione significativa.

IMPORTANTE: Le variazioni riportate da questa misura sono intrinseche al processo esponenziale dell'amplificazione in tempo reale e non sono dovute al Rotor-Gene Q MDx. Prove simili eseguite su termociclatori basate su blocco darebbero una variazione maggiore a causa della minore uniformità termica di questi sistemi. Se si vogliono confrontare i termociclatori, consigliamo di confrontare la deviazione standard del valore C_T .

Nota: Nell'Appendice B sono disponibili informazioni più dettagliate sugli intervalli di confidenza.

Nota: Ad esclusione di Color, Name, Ct e Ct Comment, ogni colonna può essere visualizzata o nascosta cliccando con il tasto destro sulla finestra e poi selezionando o deselegnando il nome della colonna.

No.	C	Name	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var
1		3x10 ⁸	Analysis		300.000.000,	324.345.068,	8,1%
2		3x10 ⁸	✓ No.		300.000.000,	301.264.230,	0,4%
3		3x10 ⁸	✓ Color		300.000.000,	308.453.920,	2,8%
4		3x10 ⁸	✓ Name		300.000.000,	298.576.301,	0,5%
5		3x10 ⁷	Type		30.000.000,	27.524.578,	8,3%
6		3x10 ⁷	✓ Ct		30.000.000,	26.405.444,	12,0%
7		3x10 ⁷	✓ Ct Comment		30.000.000,	28.701.296,	4,3%
8		3x10 ⁷	✓ Given Conc (Copies)		30.000.000,	23.847.613,	20,5%
9		3x10 ⁶	✓ Calc Conc (Copies)		3.000.000,	3.392.142,	13,1%
10		3x10 ⁶	✓ % Var		3.000.000,	3.170.880,	5,7%
11		3x10 ⁶	✓ Rep. Ct		3.000.000,	3.130.752,	4,4%
12		3x10 ⁶	✓ Rep. Ct Std. Dev.		3.000.000,	3.166.396,	5,5%
13		3x10 ⁵	✓ Rep. Ct (95% CI)		300.000,	321.913,	7,3%
14		3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc.		300.000,	305.744,	1,9%
15		3x10 ⁵	Rep. Calc. Conc. (95% CI)		300.000,	312.045,	4,0%
16		3x10 ⁵			300.000,	324.696,	8,2%
17		3x10 ⁴	19,47		30.000,	32.420,	8,1%
18		3x10 ⁴	19,59		30.000,	29.872,	0,4%
19		3x10 ⁴	19,53		30.000,	31.102,	3,7%
20		3x10 ⁴	19,52		30.000,	31.301,	4,3%
21		3x10 ³	22,93		3.000,	2.850,	5,0%
22		3x10 ³	22,96		3.000,	2.793,	6,9%
23		3x10 ³	22,94		3.000,	2.825,	5,8%
24		3x10 ³	22,91		3.000,	2.888,	3,7%
25		3x10 ²	26,03		300,	322,	7,5%
26		3x10 ²	26,11		300,	305,	1,6%
27		3x10 ²	26,26		300,	275,	8,5%
28		3x10 ²	26,18		300,	291,	3,1%

Per maggiore comodità, la funzione "AutoStat" calcola automaticamente la media, la deviazione standard e i valori minimi e massimi dei campioni in questione. Selezionare i risultati che interessano trascinandovi sopra il cursore con il pulsante sinistro del mouse, e i valori saranno visualizzati in una tabella sulla destra del monitor.

In questa schermata, si analizzano le concentrazioni di diversi campioni.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)				
Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	f
14.42	3000000	28255064	5.8%	
14.59	3000000	25142920	16.2%	
14.40	3000000	28730050	4.2%	
17.44	3000000	3422624	14.1%	
17.58	3000000	3103391	3.4%	
17.42	3000000	3467111	15.6%	
20.99	300000	285353	4.9%	
20.92	300000	298898	0.4%	
21.04	300000	275802	8.1%	
24.20	300000	30796	1.0%	

Statistics	
Maximum :	28730050
Minimum :	25142920
Count :	3
Mean :	27328521
Std. Dev :	1.07537
(Orders of Mag.)	

Copy

IMPORTANTE: La funzione "AutoStat" è dipendente dal contesto. Questo significa che, ove possibile, genera solo informazioni che siano utili.

Per esempio:

- Non è possibile ottenere un intervallo di confidenza del 95% da una serie di concentrazioni calcolate selezionate, perchè bisogna tenere conto anche del modello di regressione.
- Per concentrazioni calcolate si riferisce la deviazione standard "Orders of Magnitude" (Ordini di grandezza) invece di un valore assoluto. Questa è una variazione percentuale. Per esempio, un valore di 1,07537 rappresenta una variazione del 7,54% $(278.974 - 322.611) = (300.000/1,07537 - 300.000 * 1,07537)$. Un report di un valore assoluto non ha senso per una curva standard. Il valore potrebbe essere riportato alla concentrazione più bassa per creare un errore basso percepito (± 3 copie) o alla concentrazione alta ($\pm 3.000.000$ di copie). Per questo motivo viene riportata la deviazione standard "Orders of Magnitude".
- Per le concentrazioni calcolate, viene usata la media geometrica invece di quella aritmetica. Questo tiene conto della natura esponenziale della PCR in tempo reale. Per esempio, in caso di doppie diluizioni con 1, 2, 8 e 16 copie, la media dovrebbe essere 4 copie, perchè è la metà della serie di diluizione. La media aritmetica è

invece 6,75. La media geometrica è
 $(1*2*8*16)^{(1/4)}=4$ copie.

Normalizzazione con provetta dinamica

L'opzione "Dynamic Tube" (Provetta dinamica) è selezionata per default e utilizzata per determinare il background medio di ogni campione subito prima che inizi l'amplificazione.

La normalizzazione standard semplicemente prende i primi 5 cicli e li usa come indicatore del livello di background di ogni campione. Tutti i punti dati del campione vengono poi divisi per questo valore per normalizzare i dati. Il risultato può essere poco preciso, perchè in alcuni campioni il livello di background sui primi 5 cicli potrebbe non essere indicativo del livello di background subito prima dell'amplificazione. Invece la normalizzazione con provetta dinamica usa la seconda derivata di ogni campione per determinare il punto di takeoff di ciascuno. Si fa poi la media del livello di background dal ciclo 1 a questo numero di ciclo di takeoff per ogni campione. Si ottengono così i risultati quantitativi più precisi.

Si noti che per alcune serie di dati la fluorescenza di background non è coerente durante i cicli prima che inizi l'amplificazione. In questi casi, può essere necessario deselezionare la normalizzazione con provetta dinamica cliccando su "Dynamic Tube" perchè si potrebbero ottenere risultati quantitativi meno precisi.

Correzione della pendenza del rumore

La fluorescenza di background (FI) di un campione idealmente dovrebbe rimanere costante prima dell'amplificazione. Tuttavia, a volte la FI mostra un aumento o una diminuzione gradualmente durante diversi cicli a causa delle sostanze chimiche usate. Questo produce un livello di rumore obliquo. La correzione della pendenza del rumore usa una linea ottimizzata per determinare il livello di rumore invece di una media e normalizza questa linea. Selezionando questa opzione mediante clic sul pulsante "Slope Correct" si possono migliorare i dati dei replicati se le

linee base dei campioni sono inclinate significativamente. La correzione della pendenza del rumore migliora i dati quando si osserva che i background dei dati grezzi pendono verso l'alto o il basso prima del punto di takeoff (C_T).

Se la pendenza non è stabile oppure i cicli iniziali del basale mostrano un aumento o una diminuzione significativi del segnale rispetto al resto della curva, la Correzione della pendenza del rumore può causare alcuni effetti indesiderati, quali ad es. il superamento della soglia da parte delle curve di controllo negative dovuto all'approssimazione del basale come linea ottimizzata e conseguente normalizzazione dei dati grezzi. Di conseguenza, questa funzione non migliora sempre la qualità dei dati e dovrebbe essere utilizzata soltanto se le curve dei dati grezzi presentano una pendenza stabile.

Regolazione del punto di takeoff

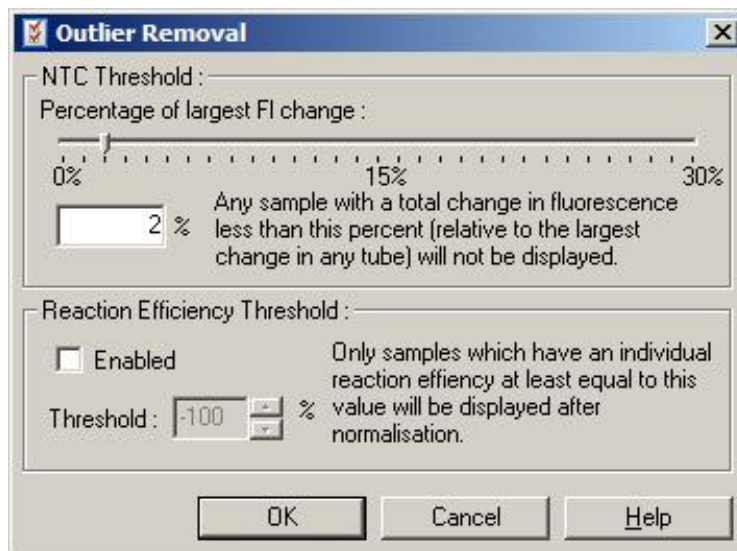
L'algoritmo di regolazione del punto di takeoff può essere impiegato per definire una lunghezza minima del basale utilizzata per la normalizzazione. Per applicare la regolazione del punto di takeoff, occorre definire due parametri. Se un punto di takeoff è calcolato dal "Dynamic Tube" inferiore al primo parametro, come punto di takeoff si utilizzerà il secondo parametro. La regolazione del punto di takeoff può essere utilizzata soltanto in abbinamento alla normalizzazione con "Dynamic Tube".

“Ignore First” (Ignora primo)

Il segnale della fluorescenza dei primissimi cicli di un processo può non essere rappresentativo del resto del processo. Per questo motivo, si possono ottenere migliori risultati ignorando i primissimi cicli. Si può ignorare un massimo di 10 cicli. Se tuttavia i primi cicli appaiono simili a quelli successivi, si otterranno risultati migliori deselezionando “Ignore First” perchè l'algoritmo di normalizzazione avrà più dati su cui lavorare.

“Outlier Removal”

Per distinguere tra cambiamenti trascurabili della fluorescenza e reazioni effettive nei controlli non-template (controlli negativi, NTC), sono previste 2 misure: “NTC Threshold” e “Reaction Efficiency Threshold”. Si consiglia “NTC Threshold” per la maggior parte delle applicazioni. L'approccio usato deve essere convalidato.



“NTC Threshold”: Consente di escludere dall'analisi campioni o NTC con un leggero spostamento verso l'alto. Nessuno dei campioni con un cambiamento sotto la soglia “NTC Threshold” sarà inserito nel report e nella colonna “CT Comment” sarà visualizzato un flag “NEG (NTC)”.

La percentuale è relativa al più ampio cambiamento massimo trovato in una provetta. Per esempio, se un campione è partito da un background di 2 FI ed è salito a 47 FI, 45 FI rappresenta il 100%. Una “NTC Threshold” del 10% considererebbe come rumore ogni campione inferiore a 4.5 FI.

“Reaction Efficiency Threshold”:

La soglia “Reaction Efficiency Threshold” è un metodo alternativo per escludere il rumore dall'analisi. Questo algoritmo di normalizzazione usa tecniche di stima dell'efficienza di reazione nella quantificazione comparativa (vedere Sezione 7.6.6). Tutti i campioni che non hanno un'efficienza di reazione almeno a questo livello vengono esclusi e nella colonna “CT Comment” è visualizzato un flag “NEG (R.Eff)”.

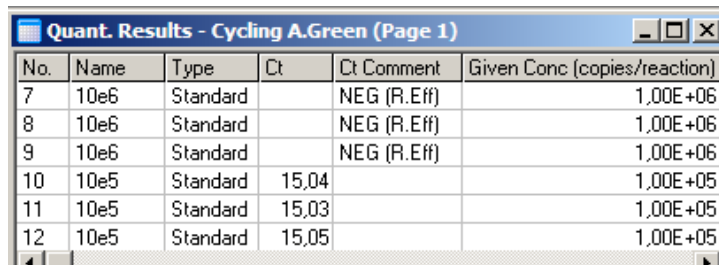
Un livello dello 0% indica che non ha avuto luogo nessuna reazione durante la fase esponenziale. Il 100% indica invece che ha avuto luogo una reazione completamente efficiente durante la fase esponenziale. Le percentuali negative indicano che il segnale fluorescente è diminuito durante la fase esponenziale.

La ricerca corrente non è conclusiva sui livelli esatti d'efficienza necessari per distinguere le reazioni vere e proprie da contaminazioni e da altri effetti. Per questa

ragione, raccomandiamo di usare questa funzione in modo conservativo, nell'ipotesi che ogni campione con una reazione genuina abbia una fase esponenziale visibile con un certo aumento della fluorescenza. Impostando questo valore sopra lo 0% si escludono alcuni campioni con un aumento della fluorescenza inefficace, ma percettibile, mentre sotto lo 0% si visualizzano campioni la cui fluorescenza è diminuita durante la fase esponenziale e che ovviamente vanno esclusi.

Nota: Se un valore è escluso a causa dell'attivazione di una di queste tecniche, non sarà visualizzato un valore corrispondente C_T nella finestra "Quantitation Results". Al tempo stesso, nella colonna "Ct Comment" sarà visualizzato un flag indicante l'esclusione. Perciò è importante che la colonna "Ct Comment" rimanga sempre visualizzata.

Nell'immagine sottostante, i campioni 7, 8 e 9 sono stati esclusi a causa della "Reaction Efficiency Threshold".



No.	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)
7	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
8	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
9	10e6	Standard		NEG (R.Eff)	1,00E+06
10	10e5	Standard	15,04		1,00E+05
11	10e5	Standard	15,03		1,00E+05
12	10e5	Standard	15,05		1,00E+05

Pendenza, amplificazione, efficienza di reazione

La pendenza (M) di una reazione (visualizzata nella finestra "Standard Curve") può essere usata per determinare l'amplificazione esponenziale e l'efficienza di una reazione con uno dei calcoli seguenti:

$$\text{Amplificazione esponenziale} = 10^{(-1/M)}$$

$$\text{Efficienza di reazione} = [10^{(-1/M)}] - 1$$

I valori ottimali per M, amplificazione esponenziale ed efficienza della reazione sono rispettivamente -3,322, 2 e 1. L'efficienza di reazione è visualizzata nel report (nei report completi e standard, vedere pag. 7-49) e nella finestra "Standard Curve".

La pendenza è calcolata come il cambiamento in C_T diviso per il cambiamento dell'immissione log (per es. numero di copie). Un'amplificazione efficiente al 100% significa un raddoppio del prodotto di amplificazione in ciascun ciclo, che dà un valore di M di -3,322, un fattore di amplificazione di 2 e un'efficienza di reazione di 1.

Dato un valore M di -3,322, i calcoli sono i seguenti:

$$\text{Amplificazione esponenziale: } 10^{(-1/-3.322)} = 2$$

$$\text{Efficienza di reazione: } [10^{(-1/-3.322)}] - 1 = 1$$

Come esempio alternativo: un valore M di 3,8 significa che la reazione ha un'amplificazione esponenziale di 1,83 e 0,83 (o 83%).

Offset

In una formula che descrive il rapporto tra 2 variabili, l'offset è espresso dalla lettera B ($y = Mx + B$). L'offset a volte è anche indicato come intercetta. B rappresenta il C_T per una concentrazione data di 1 unità. Sostituendo 1 nella formula della concentrazione come mostrato sotto:

$$C_T = \log(1) * M + B$$

$$C_T = 0 * M + B$$

Il risultato è $C_T = B$

L'intercetta può cambiare da un processo all'altro ed è una misura meno stabile del gradiente. Per questo motivo, il gradiente è analizzato più spesso dell'intercetta.

Finestra principale

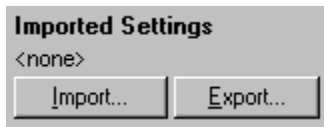
La finestra principale visualizza i diagrammi di amplificazione su una scala logaritmica.

Cliccando su “Linear Scale” (Scala lineare) in fondo alla finestra si passa dalla scala logaritmica alla scala lineare e viceversa. Passando da una scala all'altra cambia solo la visualizzazione dei grafici, non i calcoli. Lo si può verificare con lo strumento puntatore cliccando con il tasto destro sul grafico e selezionando “Show pinpointer” (Mostra puntatore). Usando una scala logaritmica, i piccoli valori sono più visibili sul grafico, mentre una scala lineare facilita la visualizzazione dell'intera reazione.

Nota: I grafici di amplificazione si aggiornano in tempo reale man mano che il Rotor-Gene Q MDx acquisisce dati durante un processo. Questo monitoraggio in tempo reale dei dati consente all'utente di vedere i risultati non appena le curve mostrano una crescita esponenziale. Si possono trarre conclusioni preliminari e prendere decisioni per il processo successivo.

Modelli di analisi quantitativa

I modelli di analisi quantitativa permettono all'utente di esportare impostazioni di normalizzazione e di soglia in un unico file *.qut. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.1.



7.6.3 Curva a due standard

L'analisi relativa dell'espressione del gene mediante un gene normalizzante può essere eseguita con il metodo della curva a 2 standard.

Il metodo richiede una curva standard per ogni gene. La concentrazione per ciascun gene è quantificata mediante la sua curva standard. L'espressione del gene che interessa è poi normalizzata con il gene normalizzante (spesso un gene housekeeping).

È importante che gli standard e i campioni replicati siano designati correttamente durante il setup del campione (vedere Sezione 6.1.4). In particolare, i campioni corrispondenti devono avere lo stesso nome in ciascuna analisi. In una reazione multipla, in cui le provette del gene d'interesse e del gene normalizzante hanno le stesse posizioni, è sufficiente una sola serie di definizioni dei campioni. Se si esegue un'analisi relativa con un gene normalizzante mediante un canale singolo (cioè reazioni eseguite in provette separate con lo stesso fluoroforo), si dovrebbero creare 2 pagine campione. La prima dovrebbe etichettare le posizioni delle provette con i nomi dei campioni per il gene d'interesse, mentre le altre posizioni sono lasciate senza nome. La seconda dovrebbe etichettare le posizioni usate per il gene normalizzante. Il software accoppierà i campioni attraverso le 2 analisi sulla base dei nomi.

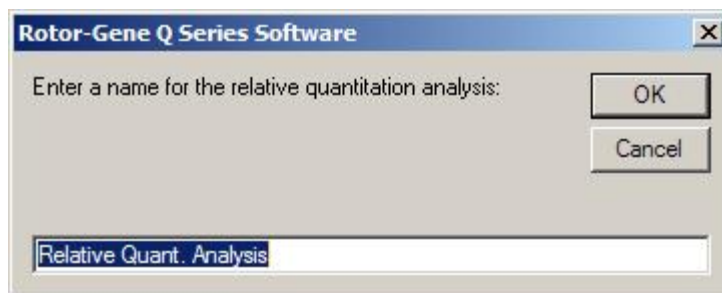
Analisi dell'espressione con il metodo della curva a due standard

I dati possono essere dapprima analizzati per ogni gene mediante analisi quantitativa. Altrimenti, i risultati di ogni gene saranno determinati automaticamente con lo strumento "Autofind Threshold" (Ricerca automatica soglia).

1. Dalla finestra "Analysis", selezionare la scheda "2 Std Curve (Rel.)" (2 curve std. (rel.)). Cliccare su "New Analysis..." (Nuova analisi).

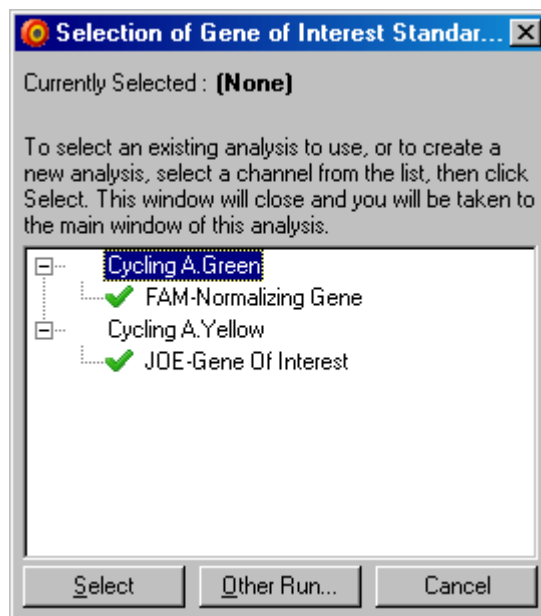
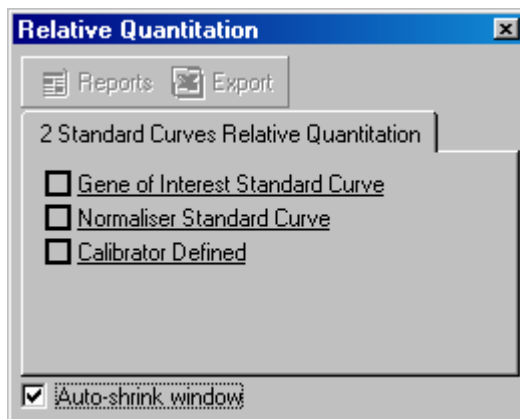


2. Immettere un nome per l'analisi.

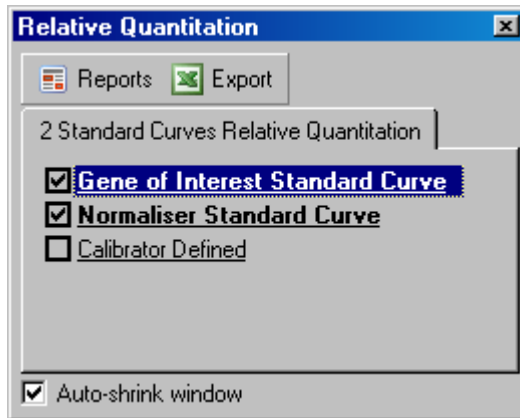


3. Indicare le pagine usate per l'analisi del gene normalizzante e per l'analisi del gene d'interesse. Per esempio, cliccando su "Gene of Interest Standard Curve" (Curva standard del gene d'interesse) si apre la finestra "Selection of Gene of Interest Standard..." (Selezione dello standard del gene d'interesse). Selezionare la pagina in cui è stato quantificato il gene d'interesse. Ripetere la procedura per il gene normalizzante. Come opzione si può definire un calibratore. Se si seleziona

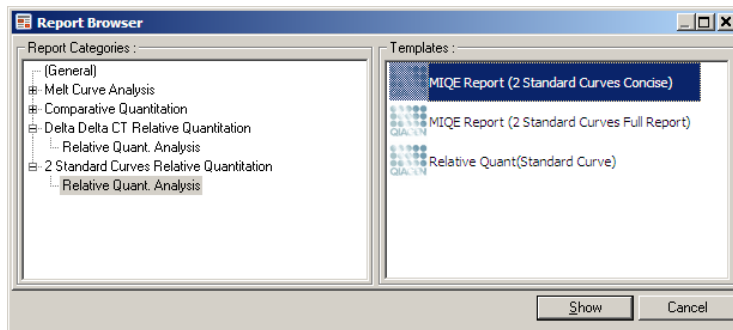
questa opzione, al calibratore viene assegnato un valore di 1 e tutte le altre concentrazioni del campione sono calcolate in relazione a questo campione.



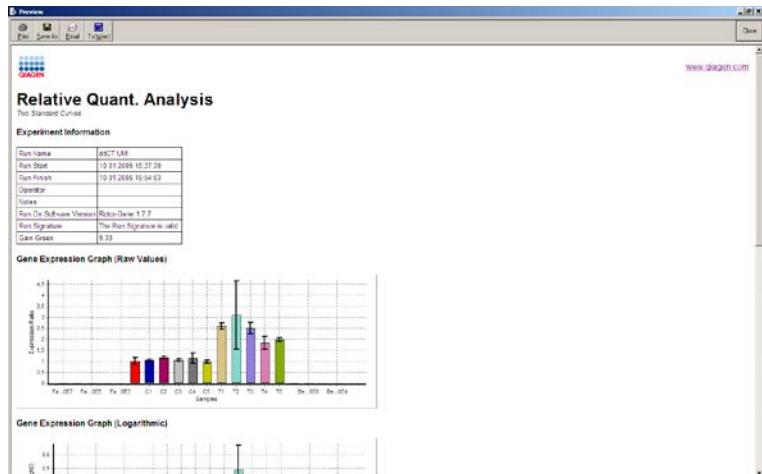
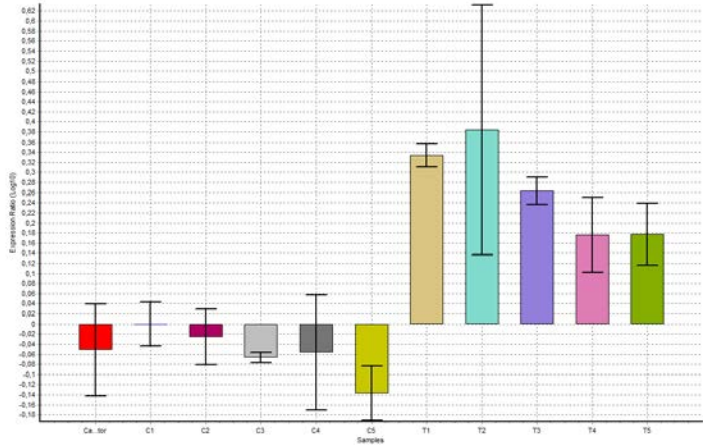
Completate le selezioni, le opzioni saranno contrassegnate da un segno di spunta come mostrato sotto.



4. Cliccare sul pulsante "Reports" per visualizzare la finestra "Report Browser". Selezionare dall'elenco l'analisi con il nome corretto. Cliccare sul pulsante "Show" per visualizzare il relativo report di quantificazione. L'opzione "Export" esporta i risultati in un nuovo foglio di lavoro Excel. Se è incluso un calibratore, i risultati sono calcolati relativamente al campione calibratore, a cui è assegnato un valore di 1.



5. Sono visualizzate le concentrazioni lette dalle curve standard per il gene d'interesse ("GOI Conc.") e per il gene normalizzante ("Norm. Conc."), come pure le concentrazioni relative ("Relative Conc."). I risultati possono essere salvati come file di Word.



6. I valori Rel Min e Rel Max sono generati dal calcolo della deviazione standard del quoziente dalle deviazioni standard del GOI e del Normalizzatore applicando la seguente formula:

$$CV_{relconc} = \sqrt{CV_{GOI}^2 + CV_{Norm}^2}$$

dove:

$$cv = \frac{s}{X} = \frac{devstd}{valoremedio}$$

7.6.4 Quantificazione relativa delta delta C_T

Il metodo delta delta C_T consente l'analisi relativa dell'espressione del gene. Il metodo è stato descritto da Livak e Schmittgen (2001)*.

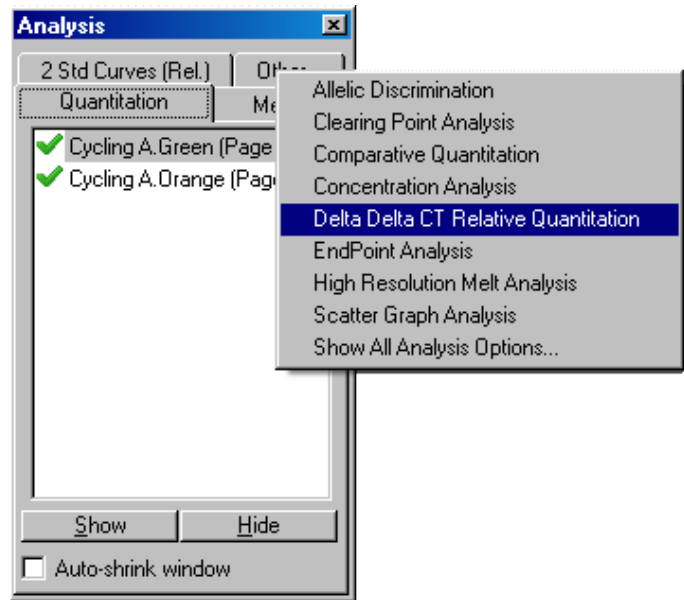
Questo metodo non richiede che in ogni processo siano incluse curve standard. Ogni campione è prima normalizzato per la quantità di stampo aggiunta per confronto con il gene normalizzante. Questi valori normalizzati sono ulteriormente normalizzati relativamente a un trattamento con calibratore. Il calibratore potrebbe essere, per esempio, un controllo non trattato wild-type o campioni al tempo zero.

È essenziale che l'efficienza di amplificazione sia identica per il gene d'interesse e per il gene normalizzante e che questo sia convalidato secondo le linee guida di Livak e Schmittgen.

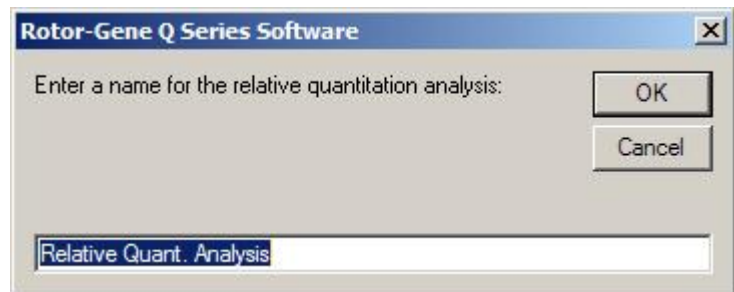
È essenziale che i nomi dei campioni siano definiti correttamente nella finestra "Edit Samples", con gli stessi campioni etichettati in modo identico in ogni analisi di quantificazione composita.

1. Analizzare i dati mediante "Quantitation" (Quantificazione). Una volta eseguita la convalida, non è necessario trovare una curva standard.
2. Dalla scheda "Other" (Altro) della finestra "Analysis", selezionare "Delta Delta C_T Relative Quantitation" (Quantificazione relativa Delta Delta CT). Selezionare "New Analysis..."

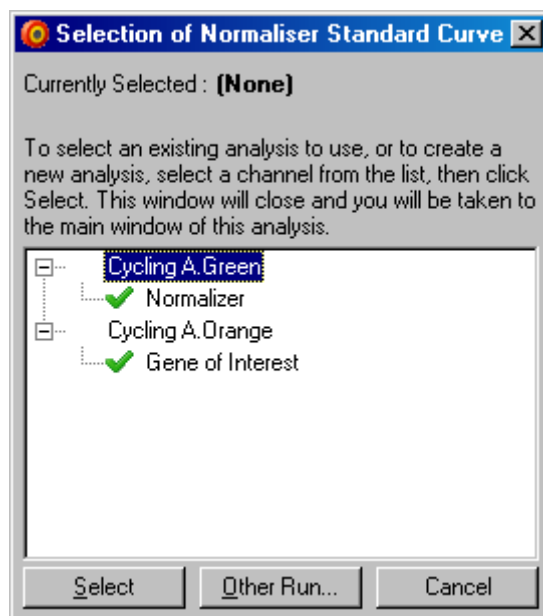
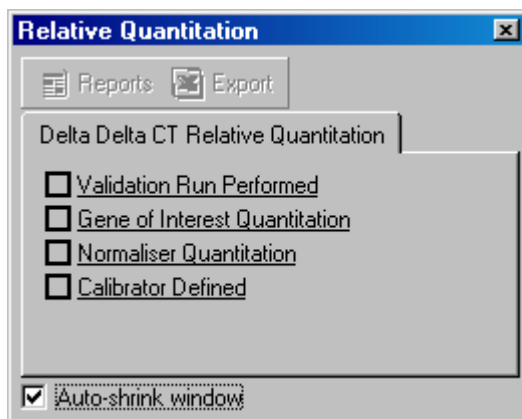
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* **25**, 402.



3. Immettere un nome per l'analisi.

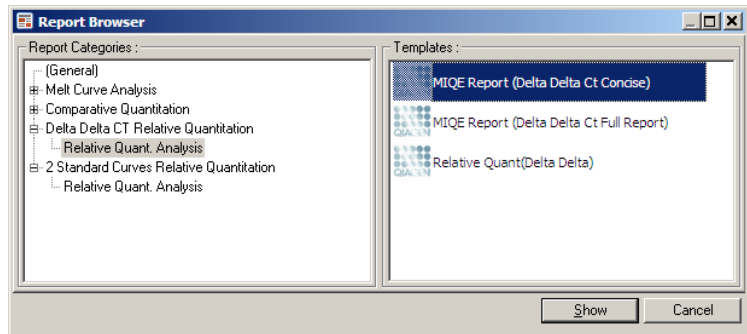


4. Si deve contrassegnare "Validation Run Performed" (Processo di convalida eseguito) per procedere con l'analisi. Definire le pagine in cui sono stati analizzati il gene d'interesse e il gene normalizzante.



5. Cliccare sul pulsante "Reports" per visualizzare la finestra "Report Browser". Selezionare dall'elenco l'analisi con il nome corretto. Cliccare sul pulsante "Show" per visualizzare il relativo report di quantificazione. L'opzione "Export" esporta i risultati in un nuovo foglio di lavoro Excel. Se è incluso un calibratore, i risultati sono relativi

al campione calibratore, a cui è assegnato un valore di 1.



Sotto è illustrato un esempio dei risultati di questa analisi. Sono visualizzati i valori C_T per il gene d'interesse ("GOI CT"), i valori C_T per il gene normalizzante ("Norm. CT"), Delta C_T , Delta Delta C_T e la concentrazione relativa ("Relative Conc."). L'espressione è relativa al campione calibratore, a cui è assegnata un'espressione relativa di 1.

Per ulteriori informazioni sulla derivazione dei calcoli Rel Min e Rel Max, consultare Litvak and Schmittgen (2001).*

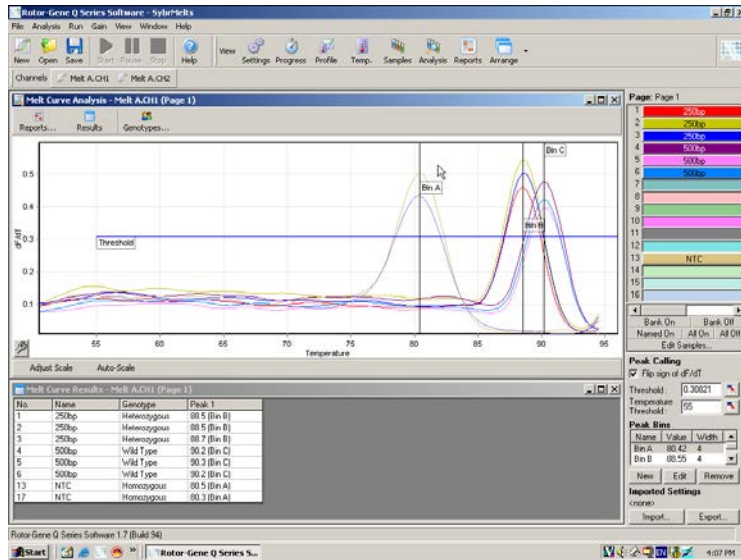
C	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Rel Min	Rel Max	Calibrator
	Dilution 8		28.37						
	Dilution 7	37.61	28.39	9.22	4.40	0.04728	0.04128	0.05414	
	Dilution 6	35.72	28.28	7.44	2.62	0.16228	0.14904	0.17669	
	Dilution 5	35.04	28.24	6.80	1.98	0.25232	0.11715	0.54605	
	Dilution 4	32.94	28.12	4.82	0.00	1.00000	0.69432	1.44025	Yes
	Dilution 3	31.66	28.23	3.43	-1.38	2.60825	2.16257	3.14579	
	Dilution 2	30.05	28.02	2.03	-2.79	6.92153	6.49040	7.38130	
	Dilution 1	28.61	27.92	0.69	-4.12	17.41896	16.47839	18.41322	
	QS 0.1 IU/μl		28.11						
	0.316 IU/μl	37.62	28.10	9.51	4.70	0.03857	0.03633	0.04094	
	1 IU/μl	36.84	28.15	8.69	3.88	0.06805	0.04415	0.10489	
	3.16 IU/μl	34.45	28.05	6.40	1.59	0.33305	0.28206	0.39325	
	QS4	32.67	28.29	4.38	-0.43	1.34925	1.09820	1.65770	
	QS3	30.07	27.98	2.09	-2.73	6.61982	6.18888	7.08076	
	QS2	26.88	27.64	-0.76	-5.57	47.61474	45.02202	50.35677	
	QS1	24.07	27.10	-3.03	-7.85	230.60440	208.45364	255.10870	

* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* **25**, 402.

7.6.5 Analisi della curva di fusione


L'analisi della curva di fusione analizza la derivata dei dati grezzi dopo lo smoothing. Questa analisi è di solito usata per genotipizzazione e discriminazione allelica. I picchi della curva sono raggruppati in bin, scartando tutti i picchi inferiori alla soglia. I bin possono essere poi mappati in genotipi mediante il comando "Genotypes" (Genotipi).


Finito il processo, per alcune sostanze chimiche si può aggiungere una fase di fusione per visualizzare la cinetica di dissociazione dei prodotti amplificati. Si aumenta la temperatura con andamento lineare e si registra la fluorescenza di ogni campione. Sotto è illustrata una tipica analisi con curva di fusione.





Peak Calling

Flip sign of dF/dT

Threshold : 0.30821 

Temperature Threshold : 55 

Peak Bins

Name	Value	Width	
Bin A	80.42	4	
Bin B	88.55	4	

New Edit Remove

Imported Settings

<none>

Import... Export...

“Flip sign of dF/dT” Prima di definire i picchi, accertarsi che il segno dF/dT sia corretto affinché il set di dati dia picchi positivi.
(Alterna segno di dF/dT):



“Defining peaks” (Definizione picchi): Nell'analisi con curva di fusione, i picchi possono essere definiti e inseriti nel report con diversi metodi. Uno di questi è di nominare automaticamente tutti i picchi per ogni campione. L'altro è di assegnare i picchi a dei bin, procedura utile per la genotipizzazione.

I bin definiscono l'area in cui si prevede la presenza di picchi. Il software dell'analisi con curva di fusione riunisce i picchi in gruppi di bin, sulla base dei valori di picco effettivi nella curva. I bin possono essere eventualmente modificati.


Tutti i picchi che rientrano nel range definito per il bin saranno assegnati a tale bin. Se si hanno 2 bin molto vicini, il picco sarà assegnato a quello più vicino.

Nota: I bin non devono essere posizionati visivamente per stimare la posizione dei picchi. Collocare i bin all'incirca nell'area d'interesse, poi utilizzare i valori effettivi riportati nella tabella dei risultati per un risultato più preciso.

„Peak Bins” (Bin dei picchi): Per definire un bin, cliccare sul pulsante “New Bin” (Nuovo bin), poi cliccare sul grafico e tenere fermo il puntatore per definire il centro del bin. Per aggiungere un altro bin, ripetere la procedura. Usare il pulsante “Remove” per cancellare i bin.

“Threshold”:
 Per impostare la soglia (asse y), cliccare sull'icona , poi cliccare sul grafico e trascinare la linea di soglia sul livello desiderato.

“Temperature Threshold” (Temperatura soglia):

Per impostare una soglia di temperatura (asse x), cliccare sull'icona , poi cliccare sul grafico e trascinare la linea di soglia sul livello desiderato. Si elimina così la soglia per le temperature più basse.

Nota: Questo è utile se il segnale contiene rumore alle basse temperature.

Report

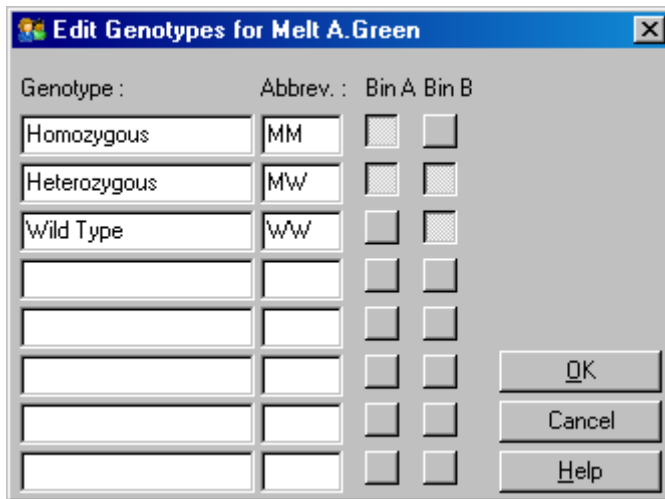
Aprire la finestra “Report Browser” dove si può generare un report in anteprima. Un report può essere generato sulla base del canale selezionato attualmente, oppure si può generare un report di genotipizzazione multicanale.

Risultati

Visualizza la finestra “Melt Curve Results” (Risultati curva di fusione) che mostra i picchi del campione.

Genotipi

Cliccare su “Genotypes...” e selezionare i genotipi, come mostrato sotto.

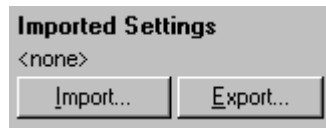


Questa finestra permette di assegnare i genotipi all'incidenza dei picchi nei bin. La configurazione di default del genotipo è visualizzata nella schermata, in cui i campioni eterozigoti hanno 2 picchi, i campioni omozigoti hanno un picco nel primo bin e i campioni wild-tipo un picco nel secondo bin. Si può immettere un'abbreviazione nel campo accanto al nome di ogni genotipo. Questo è utile quando si stampano i report di una genotipizzazione multicanale, in modo da poter leggere facilmente tutti i risultati ottenuti da più canali.

Per l'analisi multipla, si devono impostare i genotipi in ciascun canale. Se per esempio si esegue un'analisi quenched FRET a due canali, per la quale si prevede un genotipo wild-type ed eterozigote in ciascun canale, i parametri dei bin devono essere impostati per ciascun canale. I risultati saranno poi presentati in un report multiplo.

Modelli di analisi di fusione

I modelli di analisi di fusione permettono all'utente di esportare impostazioni di normalizzazione, di soglia e di genotipo in un unico file ***.met**. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.1.



7.6.6 Quantificazione comparativa

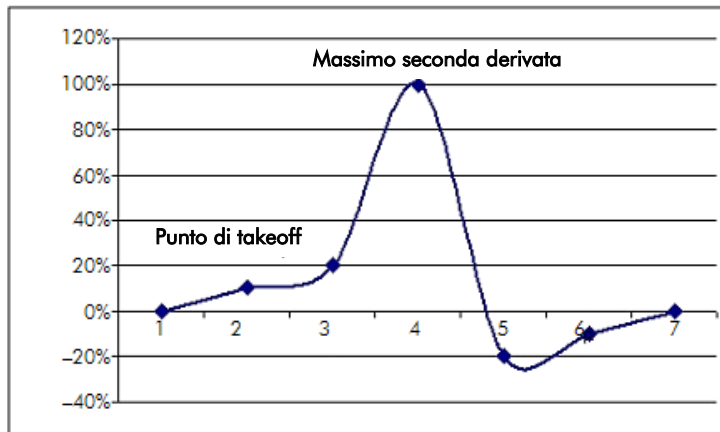
La quantificazione comparativa confronta l'espressione relativa dei campioni con un campione di controllo in un processo in cui non è disponibile una curva standard. Viene usata spesso nell'analisi con microarray. Warton e collaboratori (2004)* forniscono un esempio di questa tecnica.

1. Per eseguire l'analisi, selezionare "Other" e poi "Comparative quantitation" (Quantificazione comparativa) nella finestra "Analysis". Fare doppio clic sul canale da analizzare.
2. Scegliere un campione di controllo mediante il menu a tendina sul lato destro dello schermo sotto il toggler.
3. I risultati sono calcolati automaticamente e visualizzati nella finestra "Comparative Quantitation Results" (Risultati della quantificazione comparativa) sotto il grafico.

Le prime colonne della finestra "Comparative Quantitation Results" riportano il numero e il nome del campione. La colonna "Takeoff" dà il punto di takeoff del campione. La seconda derivata del grafico di amplificazione produce picchi corrispondenti alla percentuale massima di aumento della fluorescenza nella reazione. Il punto di takeoff è definito come il ciclo in cui la seconda derivata è al 20% del livello massimo e indica la fine del rumore e la transizione alla fase esponenziale.

* Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., and Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* **342**, 85.

Questo grafico mostra una seconda derivata di un grafico di amplificazione, che riporta le posizioni relative del picco della seconda derivata e del punto di takeoff.



La colonna "Amplification" (Amplificazione) dà l'efficienza del campione. Una reazione con efficienza al 100% darebbe un valore di amplificazione di 2 per ogni campione, il che significa che l'amplicone si è raddoppiato in ogni ciclo. Nei dati grezzi il segnale dovrebbe raddoppiarsi nella fase esponenziale. Se per esempio il segnale fosse di 50 unità di fluorescenza al ciclo 12 e poi di 51 al ciclo 13, dovrebbe arrivare a 53 unità di fluorescenza al ciclo 14. Tutti i valori di amplificazione per ogni campione sono messi in media per produrre il valore di amplificazione visualizzato sulla destra dello schermo sotto il toggler. Più la variazione tra i valori stimati di amplificazione di ogni campione è ampia, più grande sarà l'intervallo di confidenza (indicato dal valore dopo il segno \pm). L'intervallo di confidenza per un numero di campioni grande (N), dà una probabilità del 68,3% che l'amplificazione vera dei campioni rientri in questo range (1 deviazione standard). Raddoppiando l'intervallo \pm , si ottiene un intervallo di confidenza del 95,4% per un N grande.

Replicato del calibratore

Come nel metodo delta delta C_T , si richiede un campione calibratore e le misurazioni sono relative a tale campione. Si

possono analizzare replicati del calibratore perchè, se le posizioni di campioni multipli hanno lo stesso nome, si utilizzerà la media dei punti di takeoff di questi campioni. Per utilizzare correttamente questa funzione, verificare che i replicati abbiano nomi identici.



Si usa l'amplificazione media per calcolare l'espressione. Per esempio, un campione con un basso valore di amplificazione richiederà più tempo per raggiungere un certo numero assoluto di copie rispetto a un campione con un valore di amplificazione più elevato. La colonna "Rep. Conc." della finestra "Comparative Quantitation Results" riporta la concentrazione relativa. La concentrazione relativa di ogni campione rispetto al campione calibratore è calcolata in base al punto di takeoff e all'efficienza di reazione. Il tutto è espresso con notazione scientifica.

Nota: Il valore visualizzato in "Average Amplification" (Amplificazione media) alla destra di \pm rappresenta la deviazione standard dell'amplificazione media, dopo la rimozione dei valori d'amplificazione estremi. Se il valore è grande, potrebbe essere grande anche l'errore nei valori di concentrazione calcolati in generale.

Le concentrazioni relative sono calcolate dal software come segue:

1. Il punto di takeoff di ogni campione è calcolato guardando i picchi della seconda derivata.
2. Viene calcolato l'aumento medio nei dati grezzi 4 cicli dopo il takeoff. Questo è il valore di amplificazione per il campione.
3. Le amplificazioni con valori estremi vengono eliminate attribuendole a rumore nella fluorescenza di fondo.

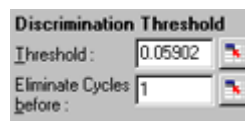
4. Si fa la media delle amplificazioni rimanenti. Questa è l'amplificazione media.
5. Si calcola il punto di takeoff medio per ogni replicato del calibratore.
6. Si calcola la concentrazione relativa per un campione come $\frac{\text{Amplification}^{\wedge}(\text{Calibrator takeoff} - \text{Sample takeoff})}{\text{Amplification}^{\wedge}(\text{takeoff calibratore} - \text{takeoff campione})}$.
7. Il risultato è visualizzato con notazione scientifica nella colonna "Rep. Conc." della finestra "Comparative Quantitation Results".

7.6.7 Discriminazione allelica

La discriminazione allelica utilizza dati cinetici in tempo reale di 2 o più canali per la genotipizzazione dei campioni. Per eseguire l'analisi, selezionare "Other" e poi "Allelic Discrimination" (Discriminazione allelica) nella finestra "Analysis". Eseguendo la discriminazione allelica, non è sufficiente il doppio clic su un canale da analizzare, perché questa analisi usa più canali contemporaneamente. Per eseguire questa analisi, tenere premuto CTRL e cliccare per evidenziare tutti i canali che si desidera analizzare, oppure trascinare il puntatore su questi canali. Una volta evidenziati i canali desiderati, cliccare su "Show". La lista si aggiorna e mostra tutti i canali allineati, con un segno di spunta accanto. Questo indica che saranno tutti usati in una sola analisi. Per eliminare uno o più di questi canali, cliccare col tasto destro sull'analisi e selezionare "Remove Analysis...". Questi canali poi potranno essere inclusi in un'altra analisi di discriminazione allelica. Si può usare un canale soltanto in un'analisi per volta.

"Reports": Apre il report della "Allelic Discrimination Analysis" (Analisi discriminazione allelica) per un'anteprima.

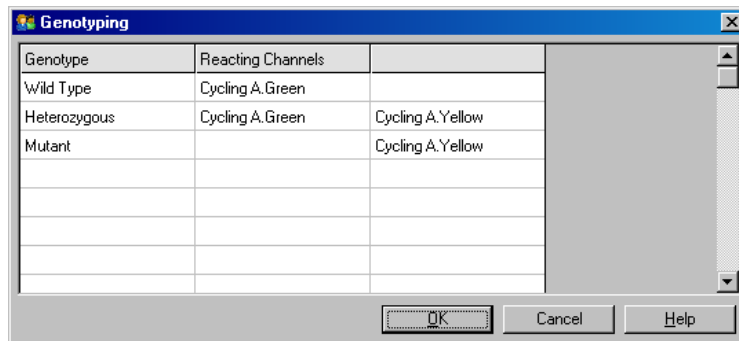
- “Results”:
- Visualizza la finestra “Allelic Discrimination Results”. Questa finestra si apre per default quando l'analisi è visualizzata per la prima volta.
- “Normalization options”:
- Sono disponibili varie opzioni per ottimizzare la normalizzazione dei dati grezzi:
- “Dynamic Tube” (normalizzazione con provetta dinamica)
 - “Slope Correct” (correzione della pendenza del rumore)
 - “Ignore First x cycles” (Ignora primi x cicli) (correzione per il rumore nei cicli iniziali)
 - Regolazione del punto di Takeoff
- Per maggiori informazioni, vedi pagina 7-30.
- “Discrimination Threshold” (Soglia di discriminazione):
- Immettere in queste caselle di testo i valori per posizionare la soglia di discriminazione. Tutte le curve che superano questa soglia sono considerate campioni di genotipizzazione. Cliccare sull'icona a destra di ogni casella di testo, poi trascinare la soglia sul grafico per impostare visivamente questi valori.



“Genotypes”
(Genotipi):

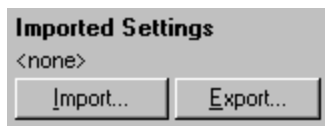
Questa funzione apre la finestra “Genotyping” (Genotipizzazione), usata per definire quale genotipo viene rilevato in ciascun canale. Questa finestra permette di assegnare i genotipi ai canali per l'analisi della discriminazione allelica.

Nell'esempio sottostante, un campione è eterozigote se i valori nei canali Cycling A.Green e Cycling A.Yellow attraversano la soglia.



Allelic analysis
templates
(Modelli di analisi
allelica):

I modelli di analisi allelica permettono di esportare impostazioni di normalizzazione, soglia e genotipo in un unico file ***.alt**. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.1.



7.6.8 Analisi Scatter graph

L'analisi scatter graph consente la genotipizzazione sulla base dell'espressione relativa dei grafici di amplificazione

trasversalmente a 2 canali. Diversamente dalla discriminazione allelica, il genotipo viene deciso sulla base delle regioni definite dallo scatter graph invece che da una soglia singola. Per eseguire l'analisi, selezionare "Other" e poi "Scatter Graph Analysis" (Analisi scatter graph) nella finestra "Analysis".

Eseguendo l'analisi scatter graph, non è sufficiente il doppio clic su un canale da analizzare, perchè questa analisi usa 2 canali contemporaneamente. Per eseguire questa analisi, tenere premuto SHIFT e cliccare per evidenziare tutti i canali che si desidera analizzare, oppure trascinare il puntatore su questi canali. Una volta evidenziati i canali desiderati, cliccare su "Show".

La lista si aggiorna e mostra tutti i canali allineati, con un segno di spunta accanto. Questo indica che saranno tutti usati in una sola analisi. Per eliminare uno o più di questi canali, cliccare col tasto destro sull'analisi e selezionare "Remove Analysis...". Questi canali poi potranno essere inclusi in un'altra analisi scatter graph. Si può usare un canale soltanto in un'analisi per volta.

"Reports": Apre il report della "Scatter Analysis" (Analisi scatter) per un'anteprima.

"Results": Visualizza la finestra "Scatter Analysis Results" (Risultati analisi scatter). Il genotipo per ogni campione è determinato dalle regioni definite dall'utente sullo scatter graph.

“Normalization options”:

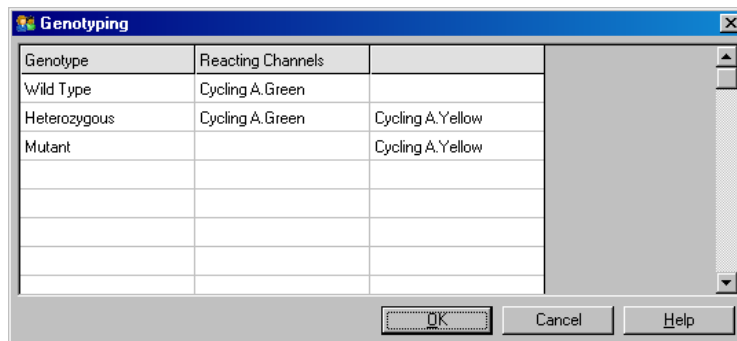
Sono disponibili varie opzioni per ottimizzare il modo in cui si ottiene la normalizzazione dei dati grezzi:

- “Dynamic Tube” (normalizzazione con provetta dinamica)
- “Slope Correct” (correzione della pendenza del rumore)
- “Ignore First x cycles” (correzione per il rumore nei cicli iniziali)
- Regolazione del punto di Takeoff

Per maggiori informazioni, vedi pagina 7-30.

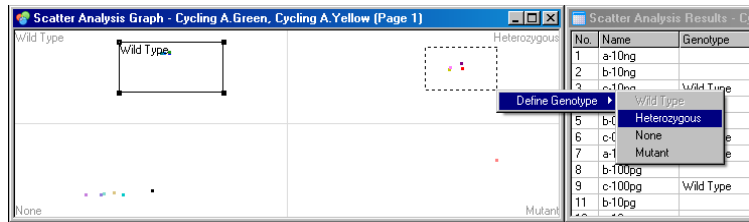
“Genotypes...”:

Questa funzione apre la finestra “Genotyping”, usata per definire quale genotipo viene rilevato in ciascun canale. In questa finestra, si possono assegnare i genotipi in base ai canali in cui reagisce un campione. I canali selezionati saranno usati per etichettare gli angoli dello scatter graph e guideranno l'utente all'area generale dello scatter graph in cui si devono definire le regioni.



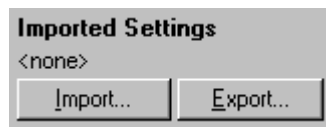
“Scatter Graph”: Lo scatter graph visualizza l'espressione relativa dei 2 canali selezionati. La visualizzazione è normalizzata per tenere conto dei differenti incrementi per moltiplicazione in ogni canale e dei logaritmi trasformati per accentuare le differenze di espressione tra i campioni.

Per eseguire la genotipizzazione, l'utente definisce le regioni cliccando e trascinando una selezione sul grafico. La selezione può essere poi etichettata in base ai genotipi configurati nella finestra “Genotyping”.



“Scatter graph analysis templates” (Modelli di analisi scatter graph):

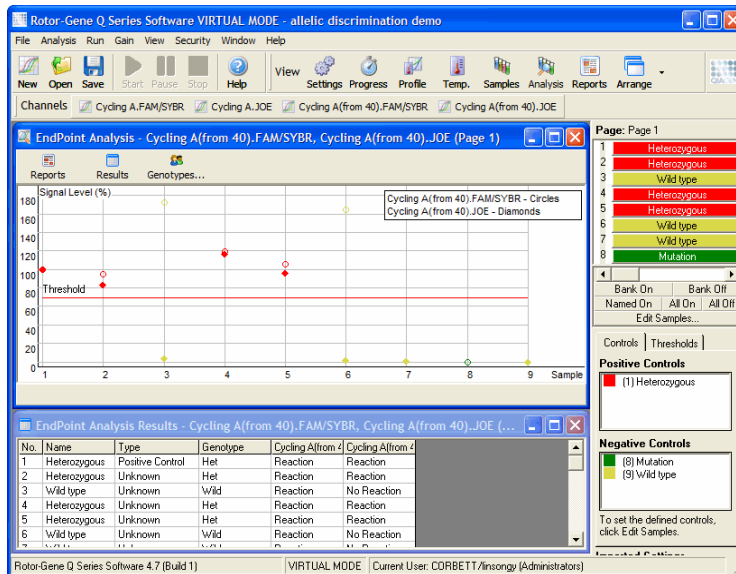
I modelli di analisi scatter graph permettono di esportare impostazioni di genotipo e regione in un unico file *.sct. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.1.



7.6.9 Analisi EndPoint

L'analisi EndPoint consente la discriminazione tra campioni amplificati e no alla fine di un processo. I risultati sono qualitativi (positivo/negativo), non quantitativi.

L'analisi EndPoint è mostrata nella schermata sottostante.



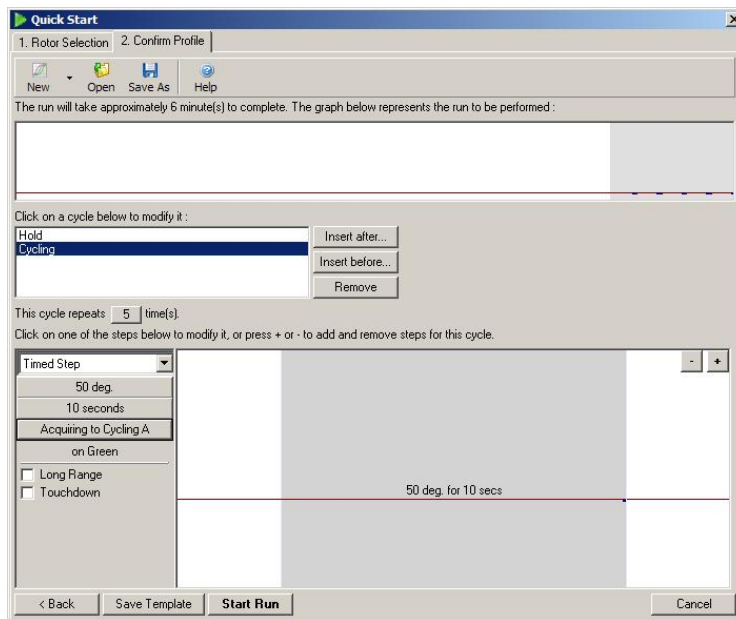
L'analisi EndPoint è simile alla discriminazione allelica, in quanto i risultati sono qualitativi e si possono assegnare dei nomi a certe permutazioni delle reazioni tra vari canali. Nell'analisi EndPoint tuttavia è disponibile un solo valore, contrariamente alla discriminazione allelica che utilizza un valore ciclo per ciclo per ogni campione. Questo significa che l'utente deve identificare i controlli positivi e negativi per facilitare l'analisi. Per i dati grezzi, i livelli del segnale sono normalizzati relativamente ai controlli noti positivi e negativi per ogni canale. L'utente poi seleziona un livello di segnale percentuale come soglia.

Termini usati nell'analisi EndPoint

Spieghiamo qui di seguito alcuni dei termini usati nell'analisi EndPoint.

- “Positive control” (Controllo positivo): È un campione di cui è nota la capacità di amplificazione.
- “Negative control” (Controllo negativo): È un campione di cui è nota l'incapacità di amplificazione. Questo rappresenta il tipico segnale di fondo.
- “Threshold”: La soglia è un livello di segnale al disopra del quale si dice che un campione è positivo (amplificato). Questa impostazione deve essere aggiustata dall'utente per ogni processo.
- “Signal level” (Livello del segnale): Una percentuale del segnale fluorescente, normalizzato in modo che il segnale più elevato dei controlli positivi rappresenti il 100% e quello più basso dei controlli negativi lo 0%.
- “Genotype”: Un'interpretazione di differenti permutazioni delle reazioni su canali diversi. Per esempio, non si è potuto assegnare il genotipo "eterozigote" ai campioni che hanno reagito in entrambi i canali Green e Yellow. Il genotipo può essere usato anche per riportare i risultati delle reazioni con i controlli interni. Per esempio i risultati possono essere riportati come "inibito", "positivo" o "negativo" a seconda che una reazione sia stata rilevata o no in certi canali.

Configurazione del profilo



Per eseguire l'analisi EndPoint, eseguire un profilo con una sosta a 50°C per diversi minuti, poi una fase di ciclo con 1 fase (50°C per 10 secondi) con acquisizione sul canale richiesto. Impostare su 5 il numero delle ripetizioni, come mostrato sopra. Questo numero serve solo come guida e può variare per le applicazioni particolari dell'utente. Più ripetizioni sono previste nel profilo, maggiori sono le informazioni disponibili per l'esecuzione dell'analisi. L'analisi fa automaticamente la media di tutte le rilevazioni per ottenere un valore singolo per ogni campione. Non è richiesto un numero specifico di ripetizioni. A meno che non sia richiesto un livello altissimo di precisione, 5 ripetizioni sono di norma sufficienti.

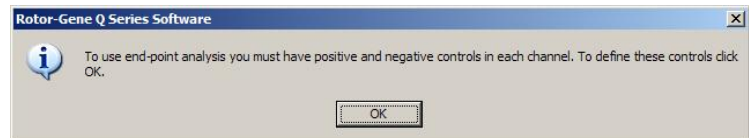
Analisi

L'analisi EndPoint può essere eseguita su vari canali contemporaneamente. Per creare una nuova analisi, cliccare sulla scheda "EndPoint", selezionare i canali trascinandovi sopra il puntatore del mouse e poi cliccare "Show".



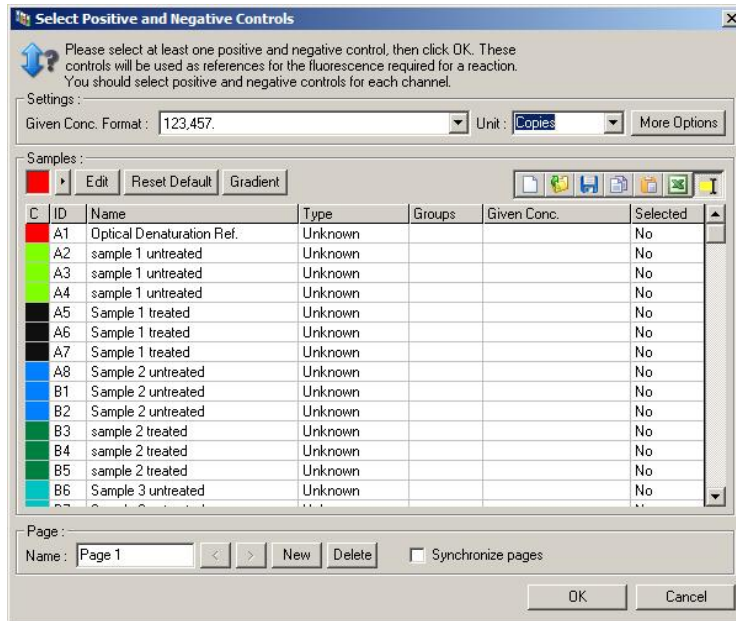
Definizione dei controlli

Quando si apre un'analisi EndPoint per la prima volta, viene visualizzato il seguente messaggio se non sono stati definiti controlli positivi e negativi.



Fare clic su "OK". Si apre la finestra "Edit Samples" che permette di definire i controlli positivi e negativi. Per definire un campione come controllo positivo o negativo, cliccare sulla cella del tipo di campione, poi selezionare il tipo di controllo relativo dal menu a tendina.

Nota: Per eseguire l'analisi, i controlli devono essere attivati su "on" mediante il togger sulla destra della finestra principale.



Questa schermata funziona nello stesso modo della finestra "Edit Samples", (Sezione 6.1.4).

Normalizzazione

La normalizzazione dei dati dell'analisi EndPoint ridimensiona tutti i livelli dei segnali entro il range 0–100%. Si devono selezionare almeno un controllo positivo e uno negativo, o più di uno se si analizzano canali multipli e gli standard non sono moltiplicati. Si dovrebbe analizzare più di un controllo positivo e uno negativo se c'è il rischio che un controllo positivo possa non amplificarsi.

1. Per ogni canale sono analizzati tutti i controlli positivi, e quello con la fluorescenza più elevata viene impostato come 100%. Questo significa che, se si analizzano controlli duplicati, un controllo positivo può andare a vuoto senza compromettere il processo.
2. Sono analizzati tutti i controlli positivi, e quello con la fluorescenza più bassa viene impostato come 0%.

3. I valori grezzi della fluorescenza dei campioni rimanenti sono messi in scala relativamente al controllo positivo più elevato e a quello negativo più basso.

Per esempio:

Campione	Tipo	Fluorescenza
1	Controllo positivo	56.3
2	Controllo positivo	53.0
3	Controllo negativo	4.5
4	Controllo negativo	4.3
5	Campione	48.1
6	Campione	6.4

Questo processo è riuscito pienamente, in quanto 2 controlli positivi e 2 negativi sono vicini tra loro e sono al di fuori dei valori di fluorescenza dei campioni.

I valori normalizzati sono:

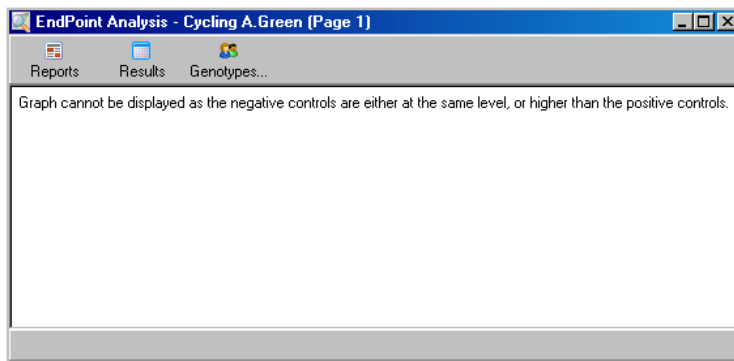
Campione	Tipo	Espressione (%)
1	Controllo positivo	100,0
2	Controllo positivo	93,7
3	Controllo negativo	0,4
4	Controllo negativo	0,0
5	Campione	84,2
6	Campione	4,0

Il campione 1 era il controllo positivo con la massima fluorescenza, quindi è stato impostato come 100%. L'altro controllo positivo era leggermente più basso. Il campione 4, il controllo negativo più basso, è stato impostato come 0%. Così è ora chiaro che il campione 5 si è amplificato, mentre il campione 6 probabilmente no.

Nota: A seconda dei controlli positivi e negativi scelti, è possibile ottenere livelli d'espressione superiori al 100% o inferiori allo 0%. Un risultato superiore al 100% può essere

interpretato nel senso che il campione è espresso in misura più elevata dei controlli positivi. Un risultato inferiore allo 0% può essere interpretato nel senso che è meno probabile che il campione si sia amplificato piuttosto che si siano amplificati i controlli negativi. Poiché l'analisi è qualitativa, questi risultati non devono preoccupare.

Se i controlli negativi danno una fluorescenza superiore ai controlli positivi, i campioni sono stati preparati in modo non corretto e viene visualizzato il seguente messaggio.



Normalizzazione in canali multipli

È possibile analizzare i dati del segnale su più canali, ma il setup del campione è più complesso. L'analisi EndPoint ipotizza che venga eseguita un'analisi multipla e quindi ogni provetta può avere solo una singola posizione. Attualmente non è possibile analizzare un setup in cui una posizione campione sia un controllo positivo per un canale e un controllo negativo per un altro.

Sebbene nella finestra "Edit Samples" sia data un'unica definizione del campione per ogni posizione di provetta, la normalizzazione avviene indipendentemente per ogni canale.

Se una posizione provetta è un controllo positivo per almeno un canale, deve essere specificata come controllo positivo nella colonna "Type" della finestra "Edit Samples". Altrimenti il tipo deve essere "Sample" (Campione). Questo vale anche per i controlli negativi.

Per esempio, se un campione è un controllo positivo nel canale verde, ma non in quello giallo, il campione deve essere comunque definito come controllo positivo. Poichè si usa il controllo positivo più alto in ciascun canale, se c'è almeno un controllo positivo che è stato amplificato nel canale giallo, la definizione del campione come controllo per il canale verde viene ignorata.

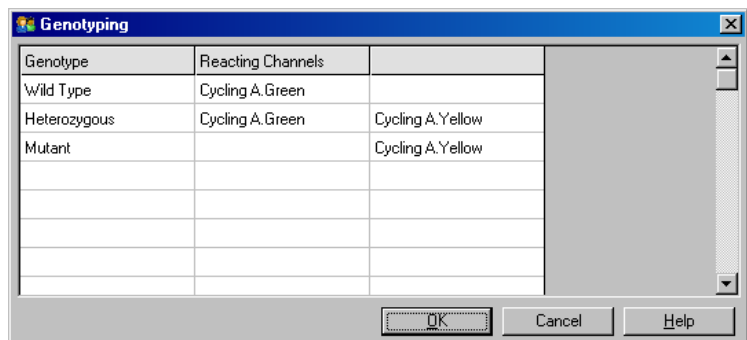
Soglia

La soglia è usata per determinare l'espressione percentuale richiesta per una reazione in ogni canale. Una volta definiti i controlli positivi e negativi, tutti i canali saranno normalizzati sulla stessa scala 0-100%. Per questo motivo occorre una sola soglia, anche se si analizzano più canali.

Cliccare sulla linea di soglia e trascinarla in un'area tra 0 e 100. La soglia non dovrebbe essere troppo vicina ai campioni sui due lati della linea, perchè questo indicherebbe che il processo non è conclusivo. Se la differenza tra un campione definito come amplificato o non amplificato è solo di pochi punti percentuali, significa che ripetendo la reazione il campione potrebbe apparire sull'altro lato della soglia.

Genotipi

Questa opzione apre la finestra "Genotyping", usata per definire quale genotipo viene rilevato in ciascun canale.

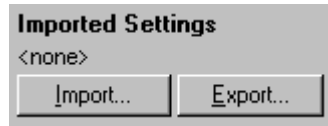


Questa finestra permette di assegnare i genotipi ai canali. Nell'esempio sopra, un campione è eterozigote se i valori nei

canali Cycling A.Green e Cycling A.Yellow attraversano la soglia.

Modelli di analisi EndPoint

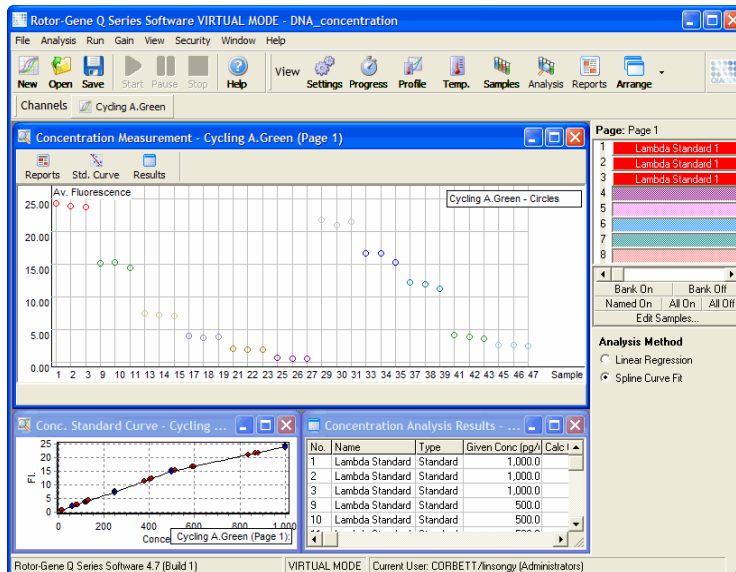
I modelli di analisi EndPoint permettono all'utente di esportare impostazioni di genotipizzazione e di soglia in un unico file *.ent. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere Sezione 8.1.



7.6.10 Analisi della concentrazione

L'analisi della concentrazione permette di usare il Rotor-Gene Q MDx per misurare le concentrazioni del DNA o per ottenere valori fluorometrici.

La schermata sottostante mostra questa analisi.



Preparazione di un processo

Per eseguire l'analisi della concentrazione, per prima cosa preparare gli standard e i campioni fluorescenti, possibilmente in triplicato.

Preparazione degli standard

Si usa una curva standard per determinare la concentrazione del DNA per ogni campione misurato.

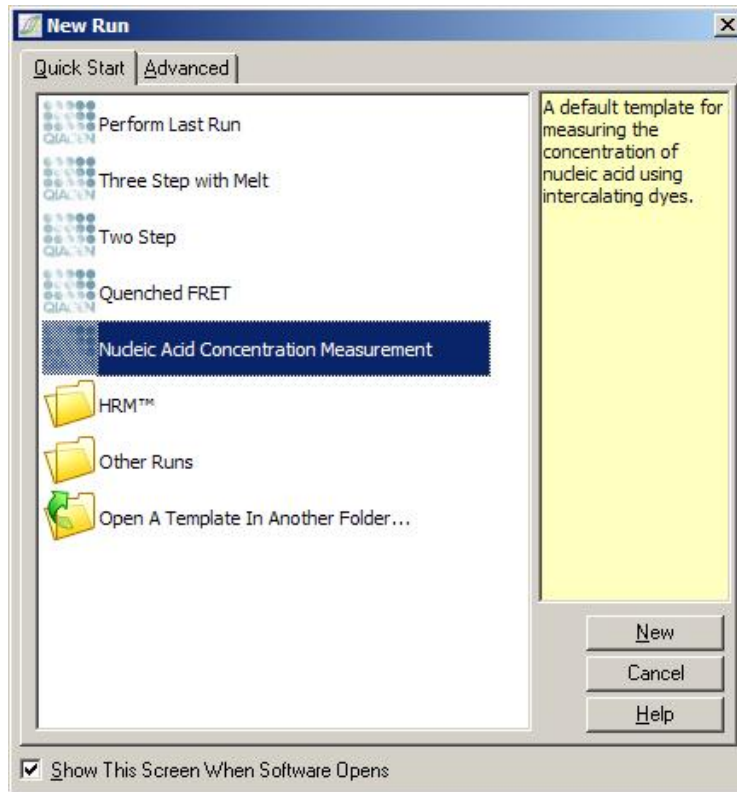
Il DNA usato per la curva standard dovrebbe essere di tipo simile a quello usato nei campioni da misurare. Determinare la concentrazione di almeno un campione di DNA con spettrofotometria UV, in quanto questo campione deve essere usato come standard. Utilizzare un minimo di 3 standard (con replicati). È importante che gli standard di DNA usati nel rilevamento della fluorescenza siano solo lineari nel range di 1–100 ng/μl. Entro questo range, se la concentrazione di DNA si dimezza, altrettanto si verifica per il valore della fluorescenza. Gli intervalli di confidenza per qualsiasi concentrazione esterna a questo range sono molto ampi a causa della mancanza di linearità delle sostanze chimiche.

Tipo di DNA misurato

Si sono osservate differenze nella misurazione di varie forme di DNA (per es. DNA genomico rispetto a DNA plasmidico). Pertanto si devono misurare insieme solo tipi di DNA simili, evitando l'uso di DNA plasmidico come standard quando si misura il DNA genomico.

Preparazione del processo

Per preparare il processo, selezionare "Nucleic Acid Concentration Measurement" (Misurazione concentrazione acido nucleico) dalla guida "Quick Start".



Nota: Accertarsi che nella posizione provetta 1 sia analizzato un controllo positivo, ad es. uno standard ad alta concentrazione. Senza un controllo positivo, il software non è in grado di ottimizzare le impostazioni del gain per la massima sensibilità. Questa condizione sarà ricordata prima di ogni processo.

Analisi

L'analisi della concentrazione mette in relazione il livello di fluorescenza con un dato valore di concentrazione. Sono disponibili due modelli di analisi. L'analisi ottimale da scegliere dipende dalle sostanze chimiche e dall'applicazione.

“Linear Regression” (Regressione lineare) analizza i dati ipotizzando un rapporto lineare e stimando i valori ignoti

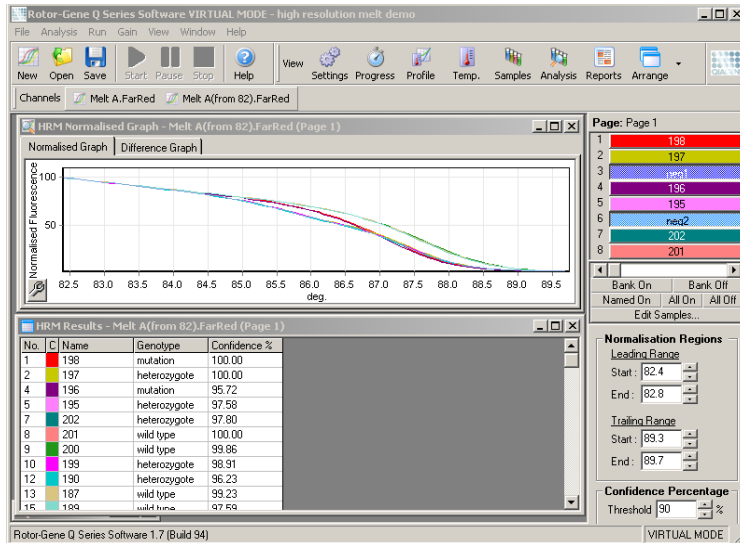
sulla base di un modello lineare generato. Determina l'errore di misurazione esaminando la deviazione dei valori da un modello lineare. Se i valori della concentrazione sono lineari, questa è l'analisi più indicata, perché fornisce all'utente un'analisi statistica della variazione (ANOVA).

“Spline Curve Fit” (Fit con curva spline) ipotizza soltanto che i valori della concentrazione aumentino con la fluorescenza. Sebbene questo metodo renda più precise le stime dei dati non lineari, non fornisce i dati ANOVA perché non ipotizza un modello lineare.

7.6.11 Analisi di fusione ad alta risoluzione

L'analisi di fusione ad alta risoluzione (HRM) caratterizza i campioni in base alla lunghezza della sequenza, al tenore di GC e alla complementarità. Si usa l'analisi HRM nelle applicazioni per genotipizzazione, quali l'analisi delle mutazioni genetiche o dei polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) e nelle applicazioni epigenetiche per l'analisi dello stato di metilazione del DNA. L'analisi HRM fornisce risultati precisi e fa risparmiare sul costo di provette ed etichette rispetto ad altri metodi.

Per eseguire l'analisi, selezionare “Other” e poi “High Resolution Melt Analysis” (Analisi di fusione ad alta risoluzione) nella finestra “Analysis”. Fare doppio clic sul canale per analizzare. Le curve di fusione ottenute dal canale grezzo sono normalizzate facendo la media di tutti i valori di fluorescenza iniziali e finali e poi forzando la corrispondenza dei punti terminali di ogni campione con la media.



Per ottenere la nominazione automatica dei campioni, cliccare su "Genotypes". Immettere il nome del genotipo, seguito dal numero del campione usato come controllo positivo per nominare automaticamente i campioni sconosciuti.

The screenshot shows the 'HRM Genotypes' dialog box. It contains a table with columns for 'Genotype' and 'Control'.

Genotype	Control
mutation	198
wild type	201
heterozygote	197

At the bottom of the dialog box, there are buttons for 'Clear', 'OK', 'Cancel', and 'Help'.

Per ulteriori dettagli sull'analisi HRM, vedere Sezione 11.

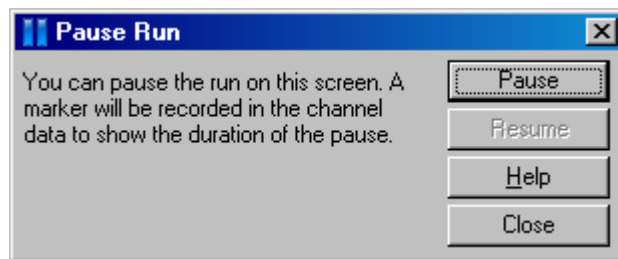
7.7 Menu di processo


7.7.1 "Start Run"

Questa opzione dà inizio al profilo di temperatura definito con le impostazioni correnti del gain. Prima che il processo inizi, viene visualizzata la finestra "Profile Run Confirmation" (Conferma profilo). Viene visualizzata una riproduzione grafica del profilo termico insieme alle impostazioni del gain per ogni canale.

7.7.2 Processo in pausa

Questa opzione consente di mettere in pausa e riprendere un processo. La pausa e la ripresa possono influire seriamente sui risultati. Per questo motivo, un contrassegno nei dati segnala l'interruzione del processo e la lunghezza della pausa. Viene anche inserito un messaggio nella scheda messaggi della finestra "Run Settings" (Impostazioni processo) (vedere Sezione 7.8.1).



<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Superficie calda [W18]</p> <p>Quando si mette in pausa un processo, il Rotor-Gene Q MDx non si raffredda completamente fino alla temperatura ambiente. Usare cautela se si maneggiano il rotore o le provette nello strumento.</p>
--	---

7.7.3 Arresta processo

Se è stata selezionata questa opzione, compare la richiesta di confermare l'arresto del processo.

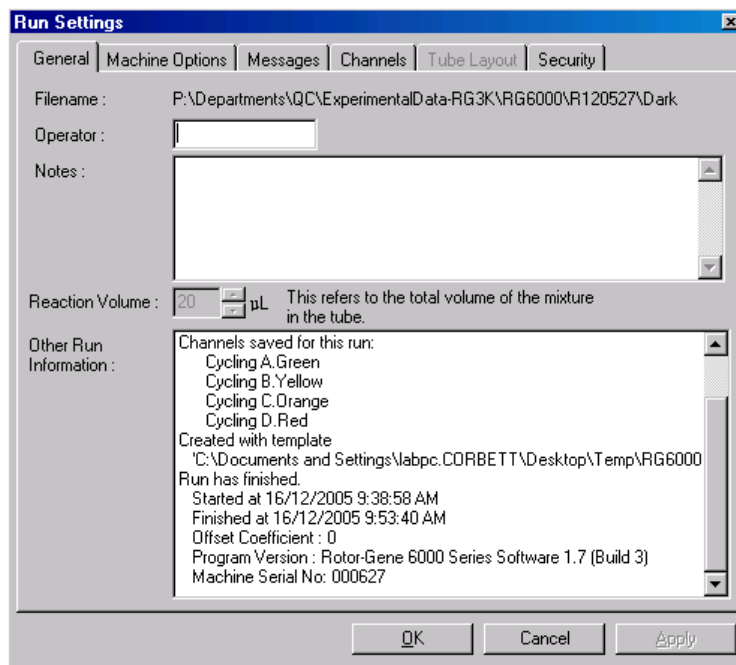
7.8 Menu di visualizzazione

7.8.1 "Run Settings"

Generalità

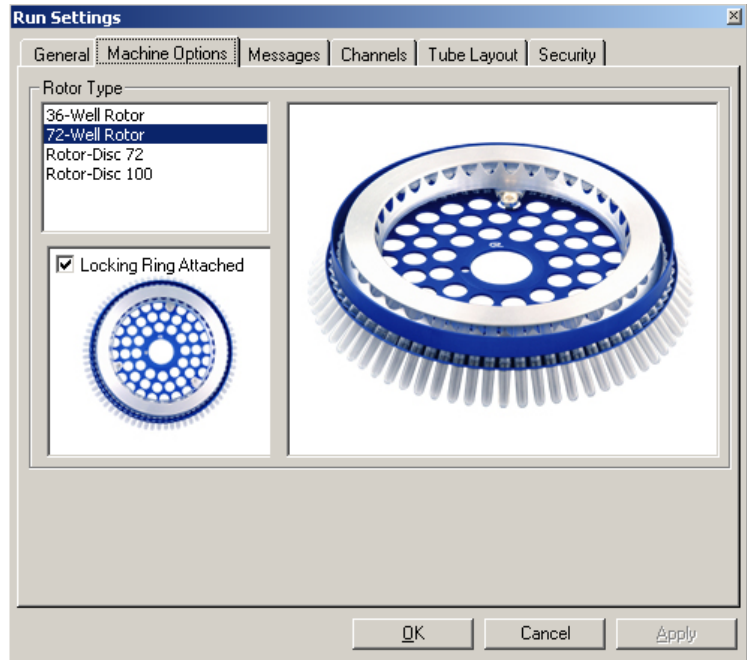
Questa finestra permette di impostare informazioni del processo, nome del file, data dell'analisi, operatore ed eventuali note associate.

La finestra contiene tutte le informazioni occorrenti per configurare il processo, eccettuato il profilo. Terminato un processo, questa finestra visualizza le seguenti informazioni: termociclature usate, impostazioni del gain, numero dei canali, ora di inizio e di fine.



Opzioni macchina

Questa scheda visualizzazione le impostazioni di configurazione del Rotor-Gene Q MDx.



Il rotore deve essere impostato su quello attualmente installato sul Rotor-Gene Q MDx. Se si apre un processo esistente, questa impostazione rifletterà il rotore che era installato allora nel termociclatore.

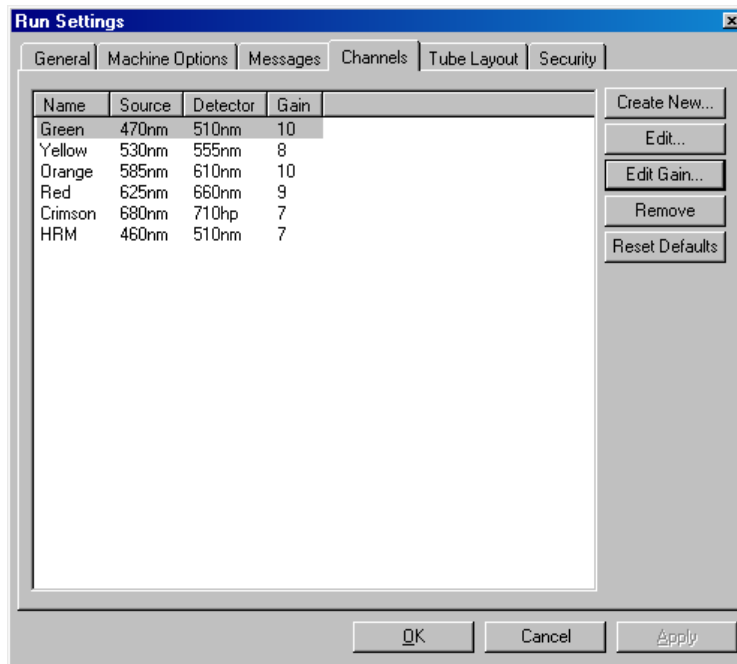
Messaggi

Questa scheda visualizza messaggi indicanti che l'utente ha fatto dei cambiamenti, quali messa in pausa del termociclatore o salto di cicli durante un processo. Visualizza anche le avvertenze ricevute durante un processo. Controllare questa scheda se i risultati non sono quelli previsti.

Canali

Se si sta configurando un nuovo processo, la scheda canali visualizza la configurazione attuale dei canali disponibili. Se si visualizza un processo esistente, le informazioni fornite rappresentano la configurazione dei canali al momento dell'esecuzione del processo. Se un processo altera le

impostazioni dei canali, è possibile ripristinare i canali di default cliccando su "Reset Defaults" (Ripristina default).



"Name"
(Nome): È il nome del canale.

"Source"
(Origine): Specifica la lunghezza d'onda d'eccitazione del LED sorgente.

"Detector"
(Rilevatore): Specifica la lunghezza d'onda di rilevamento e il tipo di filtro (nm=passa-banda, hp=passa-alto)

"Gain": Specifica il gain per quel particolare canale.

- “Create New...” (Creare nuovo...): Questa funzione permette di creare nuovi canali. Cliccando “Create New...” si apre una finestra che richiede nuovo nome, fonte e filtro di rilevamento. I filtri possono essere scelti dal menu a tendina accanto a ciascuna finestra.
- “Channels”:
- I canali verde, giallo, arancione e rosso sono la configurazione standard per il rilevamento in multiplex a 4 canali.

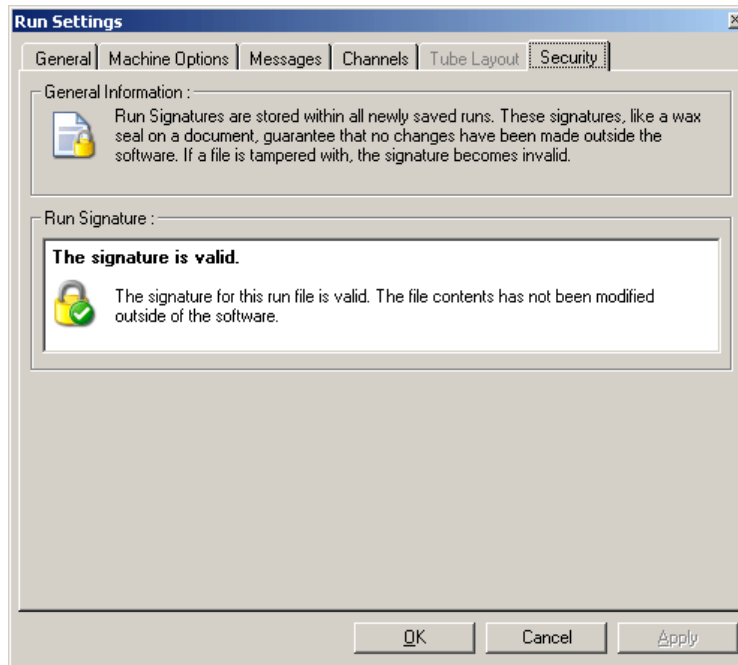
Disposizione provette

Se si usa un rotore a 72 pozzetti, i campioni possono essere disposti in modo da riprodurre fedelmente l'etichettatura di un blocco 9 x 8. Per default, la scheda del layout provette permette di etichettare i campioni in sequenza (cioè 1, 2, 3...). Questo significa che i campioni sono etichettati consecutivamente nell'ordine in cui sono collocati nel Rotor-Gene Q MDx. In alternativa, i campioni possono essere etichettati 1A, 1B, 1C, ecc. Questa opzione può essere utile se i campioni sono stati preparati con una pipetta multicanale.

Sicurezza

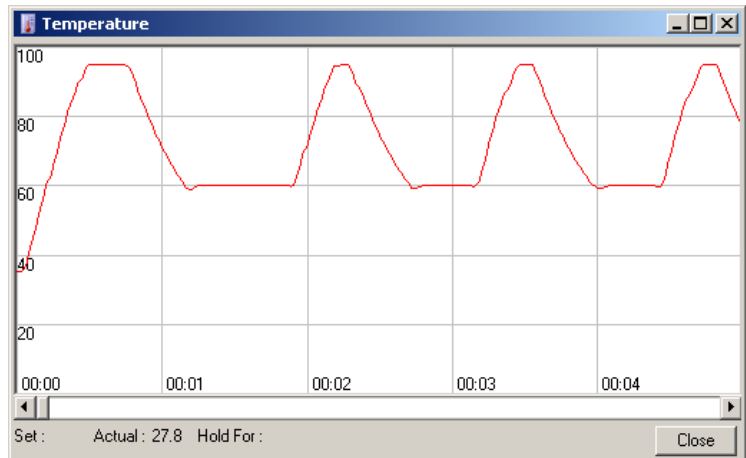
La scheda sicurezza visualizza informazioni sulla firma del processo. La firma del processo è un codice irreversibile rigenerato ogni volta che si modifica il file. Se qualsiasi sezione del file ***.rex** viene modificata al di fuori del software, la firma e il file non corrispondono più. Il controllo della firma permette di confermare che i dati grezzi non sono stati modificati al di fuori dell'applicazione, che il profilo non è stato alterato, e che il grafico termico è valido. La firma protegge anche da alterazioni quali errori di file-sistema.

Nota: Se si inviamo i file ***.rex** per e-mail, il processo di criptazione può invalidare la firma. Per evitarlo, zippare il file prima di spedirlo per e-mail.



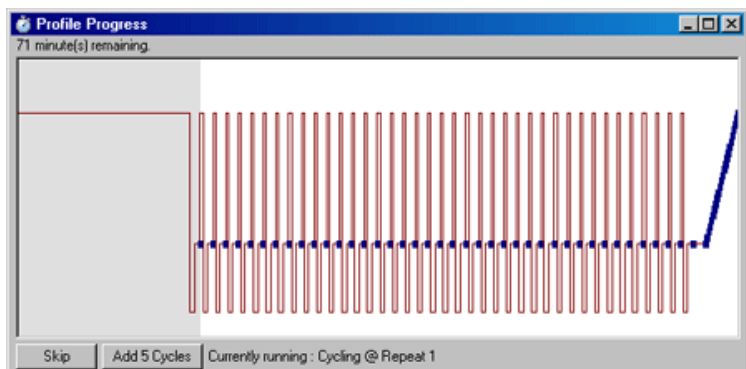
7.8.2 Grafico temperatura

Selezionare "Temperature Graph" (Grafico temperatura) dal menu "View" (Visualizza), oppure cliccare sul pulsante "Temp." per visualizzare la finestra "Temperature" (Temperatura). Il grafico mostra l'andamento delle temperature impostate durante il ciclo. Non riflette però una misura della temperatura in tempo reale. Man mano che il processo avanza, viene visualizzato il tempo di "Set" (Impostata), "Actual" (Effettiva) e "Hold" (Mantenimento) per ogni fase del programma. Nel file di un processo esistente, la finestra "Temperature" mostra la cronologia della temperatura durante il processo. La scala verticale rappresenta la temperatura e quella orizzontale il tempo. Usare la barra di scorrimento per muoversi avanti e indietro nella finestra "Temperature".



7.8.3 Progresso del profilo

Selezionare “Profile Progress” (Progresso profilo) dal menu “View”, oppure cliccare sul pulsante “Progress” (Progresso) per visualizzare la finestra “Profile Progress”. Questa finestra contiene una rappresentazione grafica del profilo termico associato al processo. Quando si esegue un processo, la parte ombreggiata della finestra indica il numero di cicli già completati. C'è anche una stima dei minuti che mancano alla fine.

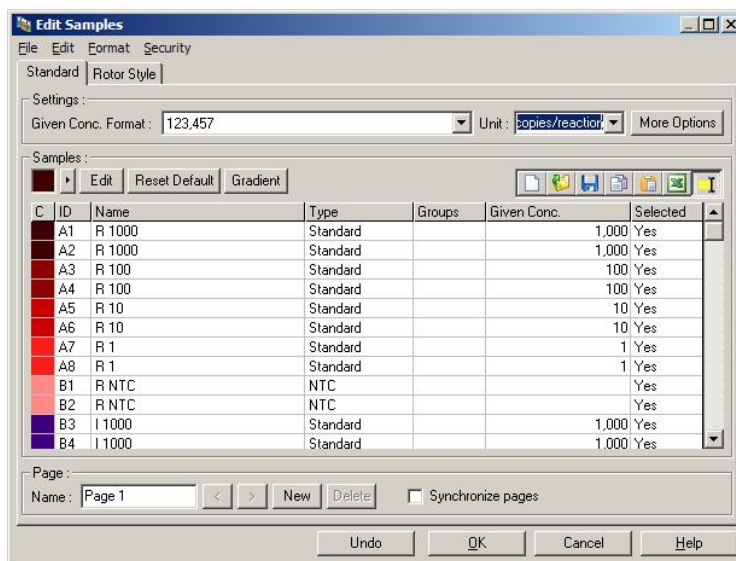


“Skip” (Salta):

“Skip” permette di saltare qualsiasi fase del profilo.

“Add 5 Cycles” “Add 5 Cycles” aggiunge 5 ripetizioni alla fase di ciclo attuale.
(Aggiungi 5 cicli):

7.8.4 Modifica campioni



Cliccare sul pulsante “Samples” (Campioni) per visualizzare la finestra “Edit Samples”. La finestra “Edit Samples” è accessibile anche cliccando con il tasto destro sull’elenco dei campioni sulla destra dello schermo. La finestra ha funzioni identiche a quelle della finestra “Edit Samples” delle procedure guidate, tranne che le funzioni della barra strumenti sono disponibili anche nei menu “File” ed “Edit”.

In alto nella finestra sono presenti quattro menu, “File”, “Edit”, “Format” (Formato) e “Security” (Sicurezza). Il menu “File” viene usato per creare una nuova finestra (vuota) “Edit Samples”, aprire un modello di campione esistente o salvare nomi di campioni come modello per uso futuro. L’estensione di questi file modello è ***.smp**. Il menu “Edit” permette anche di copiare e incollare delle intere file. Il menu “Security” permette di bloccare le definizioni dei campioni.



Questo menu a tendina è usato per selezionare un radie idoneo per la visualizzazione della concentrazione. Le concentrazioni sono formattate automaticamente radie la posizione selezionata corrente.



Questo menu a tendina stabilisce le unità di misura per il dosaggio.



Pulsante

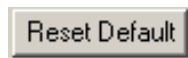
Importanza

"Line style":

Lo stile della linea può essere modificato per migliorare la leggibilità dei grafici sulle stampanti in bianco e nero. Certe rad possono essere evidenziate modificandone lo stile. Per accedere a questa funzione, fare clic sul pulsante con la freccina verso destra accanto al pulsante "Edit".



Premendo "Edit" (Modifica) si apre il selettore dei colori. Si possono selezionare diverse file quando si assegna un colore alle provette.



Cliccare "Reset Default" (Ripristina default) per riportare tutte le celle colorate selezionate ai valori cromatici di default.



"Gradient" (Gradiente) permette di scegliere un radient dal primo colore selezionato all'ultimo. In un setup del campione si possono definire vari radient.



Pulsante



Importanza

L'icona "New" azzerava la finestra "Edit Samples" in preparazione all'immissione dei dati.



L'icona "Open" apre una finestra di dialogo da cui scegliere un file del Rotor-Gene Q MDx da importare.

Nota: Il numero dei campioni della finestra aperta deve corrispondere a quello nel file da importare.



L'icona "Save" apre una finestra di dialogo in cui si possono immettere il nome e la cartella in cui sarà salvata una copia delle definizioni correnti del campione.



L'icona "Copy" copia le celle selezionate.



L'icona "Paste" incolla le celle selezionate con il comando di copia nella posizione attualmente selezionata della griglia.



L'icona "Excel" apre una finestra di dialogo che richiede un nome di file e la cartella in cui salvare le informazioni sul campione. Dopo aver premuto "Save", il file Excel si apre automaticamente.



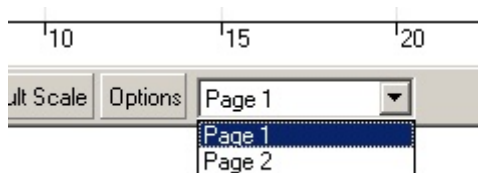
L'icona "Append/Overwrite" (Inserimento/Sovrascrittura) cambia la modalità di modifica nella finestra "Edit Samples". Se si seleziona la sovrascrittura, i dati esistenti vengono sovrascritti durante la modifica. Se si seleziona l'inserimento, durante la modifica si aggiungono nuovi dati alla fine dei dati esistenti.

“Sample Types” (Tipo campioni): I campioni possono essere definiti come uno dei vari tipi elencati nella tabella seguente,

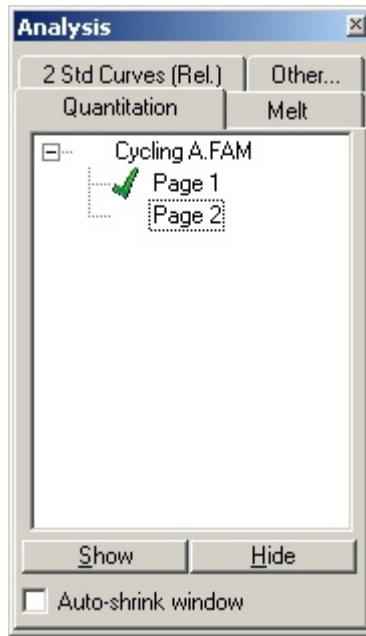
Tipo campione	Descrizione
Nessuno	Nessun campione in quella posizione
NTC	Controllo non-template
Controllo negativo	Controllo negativo
Controllo positivo	Controllo positivo
Sconosciuto	Campione sconosciuto da analizzare
Standard	Si utilizzano i valori standard per costruire una curva standard per calcolare le concentrazioni di campioni sconosciuti
Calibratore (RQ)	A un calibratore viene assegnato un valore di 1 e tutte le altre concentrazioni del campione sono calcolate rispetto a questo campione

“Page” (Pagina): Questa funzione permette all'utente di avere diverse definizioni dei campioni, e anche esperimenti separati, nello stesso processo. Questo è utile per analizzare prodotti differenti in canali differenti. Servirsi dei pulsanti freccia per spostarsi tra le pagine dei campioni. Usare i pulsanti “New” e “Delete” (Cancella) per creare e cancellare pagine. È possibile avere definizioni multiple del campione per lo stesso canale, per ottenere curve standard multiple senza multiplex. Basta definire i campioni d'interesse e le relative curve standard su pagine separate. Si può così analizzare indipendentemente il singolo canale con ciascuna serie di definizioni. Le pagine del campione possono essere etichettate “Page 1”, “Page 2” (Pagina 2) ecc. oppure possono essere nominate a piacere (per es. “Housekeeper”). Questo sarà il nome che compare nel report.

Quando si visualizzano i dati grezzi, si possono selezionare le definizioni del campione con cui visualizzare i dati mediante il menu a tendina accanto al pulsante “Options”:

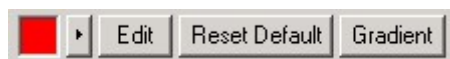


La pagina campione da usare per eseguire un'analisi può essere selezionata nella finestra “Analysis” (vedere Sezione 7.6.1).



“Given Conc.” Mostra la concentrazione per ognuno degli standard. Le unità possono essere definite come numero decimale o logaritmico. Se gli standard sono una serie di diluizione, è necessario immettere solo i primi 2 standard. Premendo ENTER (Invio), il programma aggiunge automaticamente la prossima diluizione logica nella serie.

“Line style”: Lo stile della linea può essere modificato per migliorare la leggibilità dei grafici sulle stampanti in bianco e nero. Certe linee possono essere evidenziate modificandone lo stile. Per accedere a questa funzione, fare clic sul pulsante con la freccina verso destra accanto al pulsante “Edit”.



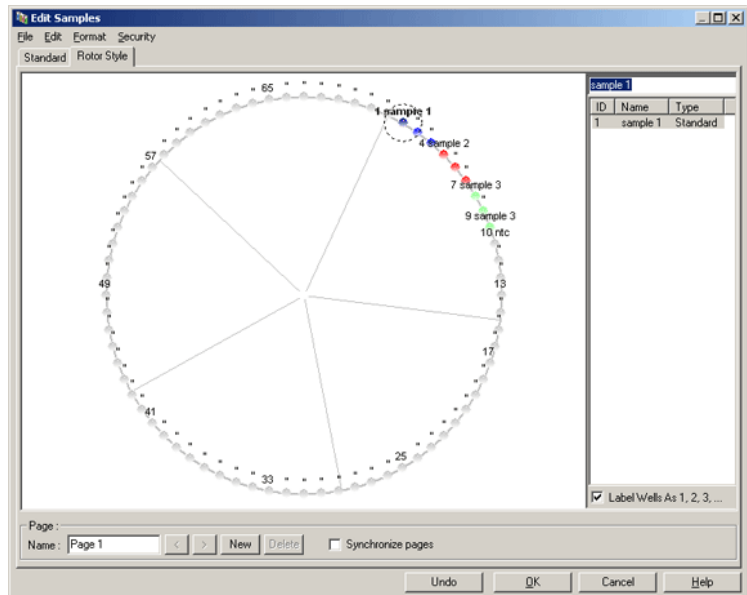
La barra degli strumenti visualizza lo stile di default "Solid" (Continua). Lo stile può essere cambiato in "Dashed" (Tratteggiata), "Dotted" (Punteggiata), "Hairline" (Sottilissima), "Thin" (Sottile) o "Thick" (Spessa). Una volta terminato, cliccare il pulsante con la freccia a sinistra per tornare alla visualizzazione "Edit", "Reset Default" e "Gradient".



- "Multiple row entry" (Immissione file multiple): Se la stessa informazione deve essere immessa in varie file insieme, selezionare tutte le file, poi iniziare l'immissione. L'informazione sarà inserita in ogni fila. Questa operazione funziona anche per la selezione dei tipi di campione, la scelta dei campioni o l'immissione di concentrazioni.
- "Sample type hotkey" (Tasto rapido tipo campione): Per selezionare rapidamente un tipo di campione, immettere la prima lettera del suo nome. Per esempio, per impostare 5 campioni come controlli non-template, selezionarli nella colonna del tipo di campione, poi premere N per NTC. Tutti i campioni saranno convertiti in NTC.
- "Save it, reuse it" (Salva, riutilizza): Una descrizione completa del campione può essere salvata come file campione (*.smp) e caricata in processi successivi con la stessa configurazione dal campione.

Stile del rotore

Questa scheda nella finestra "Edit Samples" offre un modo alternativo di immettere il nome dei campioni. Selezionare i replicati cliccando e trascinando il puntatore del mouse sull'immagine del rotore. L'elenco sulla destra della finestra viene aggiornato. Si può ora immettere il nome del campione, così impostando questo nome per la selezione corrente. Il software riconosce questi pozzetti come replicati.

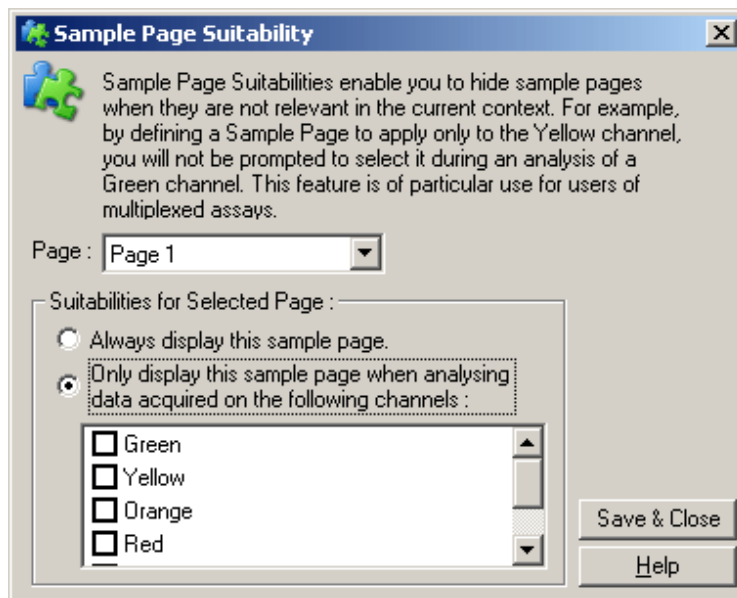


La scheda "Rotor Style" (Stile rotore) fornisce una versione ridotta della scheda "Standard" ed è destinata agli utenti che vogliono impostare rapidamente il nome e il colore del campione. In questa scheda non è possibile definire alcune impostazioni, ad esempio se il campione rappresenta uno standard o la concentrazione nota di ciascuno standard. Se c'è bisogno di definire queste impostazioni, usare la scheda standard.

“Sample Page Suitability” (Idoneità della pagina campione)

Per accedere alla finestra “Sample Page Suitability”, cliccare su “More Options” (Altre opzioni) nella finestra “Edit Samples”, e poi cliccare su “Define Suitabilities” (Definire idoneità). La finestra “Sample Page Suitability” permette all'utente di abbinare le pagine campione ai canali. Per esempio, la pagina campione per il gene d'interesse può applicarsi al canale verde, e la pagina campione del gene housekeeper al canale giallo. In questo esempio, impostando l'idoneità della pagina campione si riduce il numero delle opzioni d'analisi disponibili per includere solo quelle rilevanti per quel particolare dosaggio.

La finestra “Sample Page Suitability” è illustrata sotto.

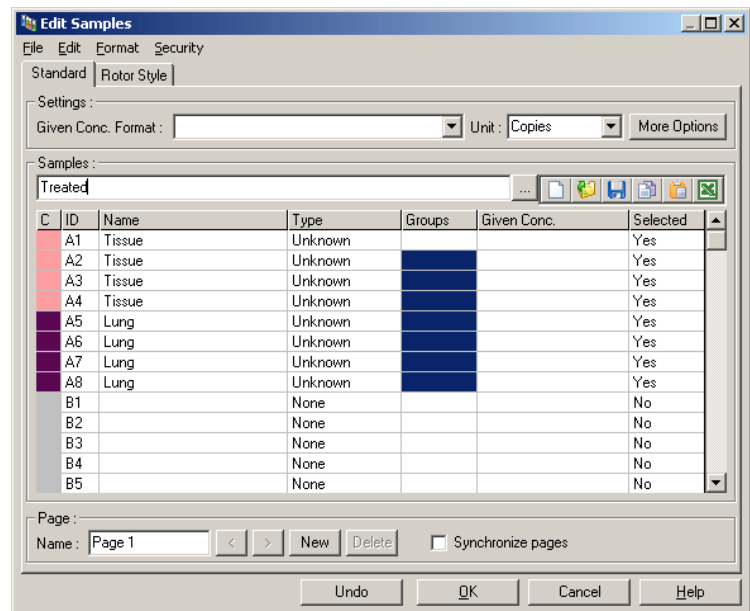


Nota: Quando si imposta un dosaggio, creare tutte le pagine campione e le relative idoneità, quindi salvarle come modello. In questo modo si riducono le operazioni di setup per ogni processo.

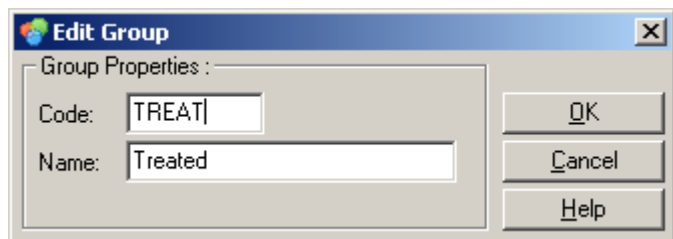
Gruppi

I gruppi di campioni permettono di calcolare le statistiche per una raccolta arbitraria di campioni. Diversamente dai replicati, che devono avere nomi identici, i campioni possono avere qualsiasi nome, possono essere posizionati ovunque nel rotore e possono appartenere a più gruppi.

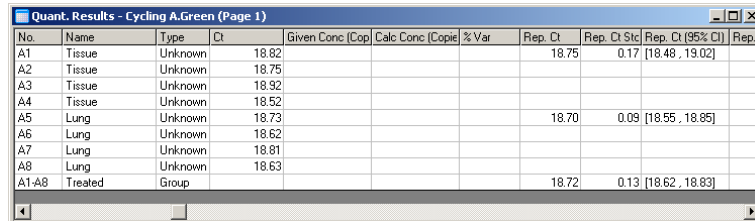
1. Per definire un gruppo, immettere il nome completo del gruppo accanto a un campione e premere ENTER.



2. Si apre la finestra "Edit Group" (Modifica gruppo).



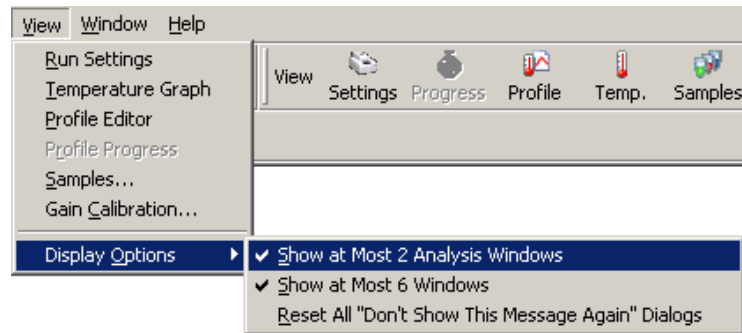
- Definire un'abbreviazione idonea, poi cliccare su "OK". L'abbreviazione ora può essere utilizzata per impostare gruppi. I risultati raggruppati, quali valore medio e intervalli di confidenza al 95%, sono calcolati automaticamente per i gruppi in qualsiasi analisi.



No.	Name	Type	Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep.
A1	Tissue	Unknown	18.82							
A2	Tissue	Unknown	18.75				18.75	0.17	[18.48, 19.02]	
A3	Tissue	Unknown	18.92							
A4	Tissue	Unknown	18.52							
A5	Lung	Unknown	18.73				18.70	0.09	[18.55, 18.85]	
A6	Lung	Unknown	18.62							
A7	Lung	Unknown	18.81							
A8	Lung	Unknown	18.63							
A1-A8	Treated	Group					18.72	0.13	[18.62, 18.83]	

7.8.5 Visualizzazione opzioni

Il menu di visualizzazione delle opzioni è illustrato sotto.



Finestra
"Show at Most 2
Analysis"
(Mostra Massimo
2 analisi):

Se questa opzione è selezionata, è visualizzato un massimo di 2 finestre di analisi contemporaneamente. Questo può risultare scomodo per la lettura se sono aperte più finestre. Selezionando questa opzione, la prima finestra di analisi viene chiusa e sostituita con l'ultima finestra aperta. Se l'opzione non è selezionata, possono essere visualizzate più di 2 finestre.

“Show at Most 6 Analysis” (Mostra massimo 6 analisi):

Per migliorare la leggibilità, il software rimuove le finestre inutilizzate quando si aprono nuove finestre. Questa opzione è abilitata per default, per mantenere sgombro lo schermo del software Rotor-Gene Q. Togliere il segno di spunta da questa opzione se è necessario vedere più di 6 finestre contemporaneamente.

“Reset All “Don't Show This Message Again” Dialogs” (Resettare tutte le finestre di dialogo “Non mostrare più questo messaggio”):

Se è selezionata questa opzione, il software visualizza nuovamente tutte le finestre di dialogo in cui era stata selezionata la casella “Do not display this message again” (Non mostrare più questo messaggio). Queste includono i messaggi riguardanti impostazioni sospette che in precedenza fossero state impostate per non essere visualizzate di nuovo. Questo può essere utile per un nuovo utente che non ha familiarità con il Rotor-Gene Q MDx o il software Rotor-Gene Q.

7.9 Menu sicurezza

Il software Rotor-Gene Q include funzioni che ne permettono il funzionamento in sicurezza. Se correttamente configurato, il software Rotor-Gene Q può garantire quanto segue:

- L'accesso al Rotor-Gene Q MDx o al software di analisi è limitato a gruppi di utenti
- Le modifiche ai file di processo sono registrate
- Le modifiche non autorizzate sono individuate (firme)
- I modelli utilizzati per i processi sono registrati
- I nomi dei campioni sono protetti

Integrazione con “Windows security”

Per fornire un livello alto di trasparenza, il software Rotor-Gene Q non gestisce internamente la sicurezza. Account,

gruppi e password sono tutti gestiti con il modello di sicurezza intrinseco di Windows (Windows Security). L'integrazione permette di controllare l'accesso al software Rotor-Gene Q con la stessa password che dà accesso ai file e ai programmi in rete, con riduzione delle operazioni amministrative. Nelle grandi organizzazioni, ad esempio, gli amministratori di rete possono facilmente togliere l'accesso agli ex utenti grazie al modello centralizzato di sicurezza.

Per questo motivo, l'impostazione sicura del software Rotor-Gene Q implica in primo luogo la configurazione dei ruoli della sicurezza Windows secondo le prassi migliori.

Prerequisiti

Per utilizzare la sicurezza, si deve disporre di Windows XP o Windows 7 Professional edition. Le funzioni di sicurezza non possono essere utilizzate con Windows XP o Windows 7 Home edition, che non possiedono il modello d'accesso sofisticato utilizzato dal software. Il software deve essere installato con l'opzione "Force authentication through Windows domain" (Forzare autenticazione mediante dominio Windows).

Nota: Il menu "Security" non viene visualizzato se si è registrati in un dominio Linux Samba. Si deve disporre o di un logon locale o di un server Windows per utilizzare le funzioni di sicurezza.

7.9.1 Configurazione di Windows XP Security

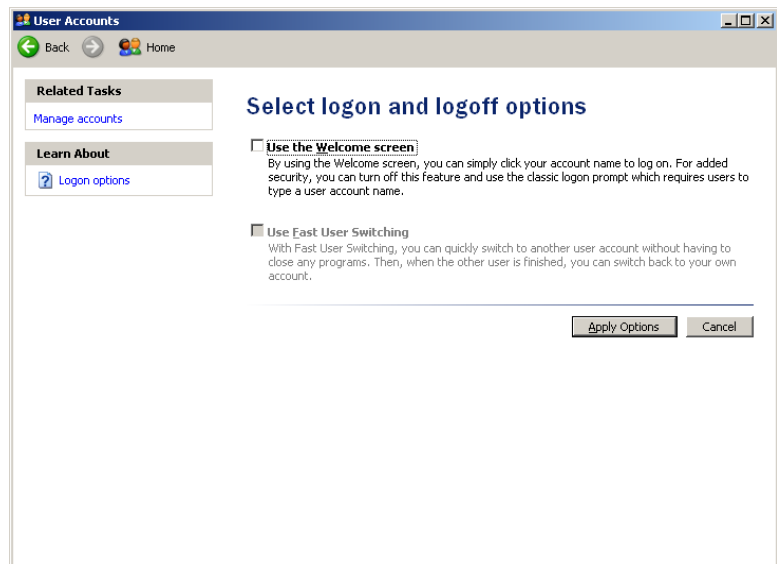
Questa sezione descrive il modo di impostazione del sistema per gestire in sicurezza il software Rotor-Gene Q.

Per utilizzare le funzioni di sicurezza, il software deve essere installato con l'opzione "Force authentication through Windows domain". Questa richiede al dominio Windows il livello di accesso e le credenziali ed è essenziale per le funzioni di trasparenza e sicurezza.

Disabilitazione dell'accesso semplice

Un metodo più sicuro per registrarsi a Windows è quello di disabilitare l'accesso semplice dalla "Schermata di benvenuto". Per modificare la schermata di accesso nella classica richiesta di logon, procedere come segue:

1. Dal pulsante "Start", selezionare "Settings" (Impostazioni), poi "Control Panel" (Pannello di controllo), seguito da "User Accounts" (Account utenti).
2. Selezionare "Change the way users log on or off" (Modifica modalità di logon e logoff utente) dalla finestra di dialogo.
3. Nella finestra successiva, disabilitare l'opzione "Use the Welcome Screen" (Utilizza la schermata di benvenuto), poi cliccare "Apply Options" (Applica opzioni).



Gestione come amministratore

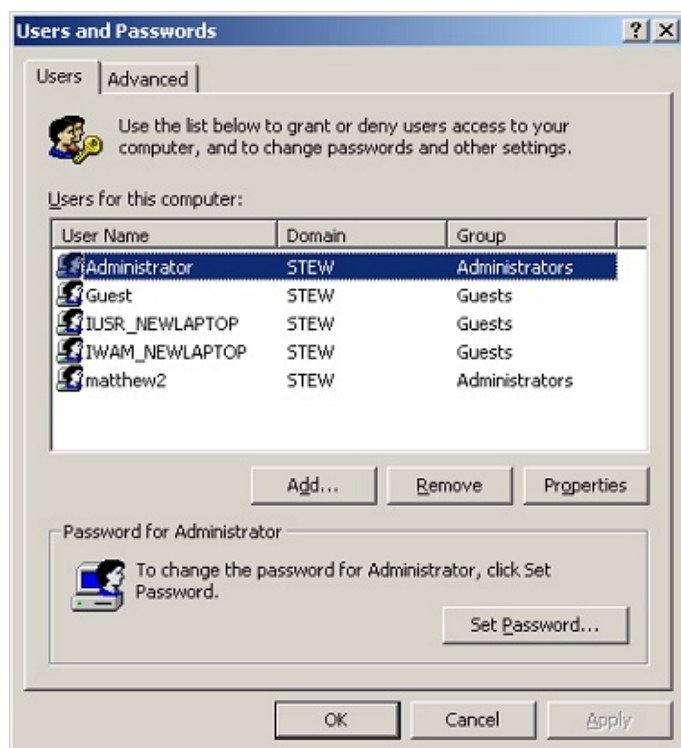
Molti utenti gestiscono il proprio computer come amministratori, senza password. Sebbene questo sia comodo, rende però impossibile determinare chi usi il computer. Questo elimina la trasparenza e impedisce

L'attivazione di molte misure di sicurezza del software Rotor-Gene Q. Quando si gestisce come amministratori, sono abilitate tutte le funzioni del software. Pertanto la gestione come amministratore assicura che tutti gli utenti che non hanno bisogno delle funzioni di sicurezza possano accedere a tutte le funzioni del software.

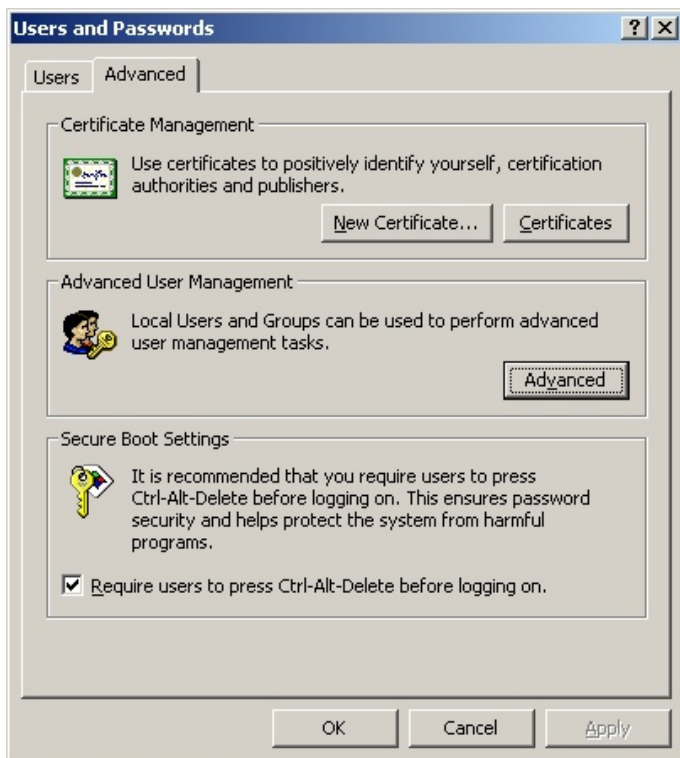
Creazione di un nuovo account utente

Crea un account per ogni utente del software. Per ogni utente ripetere le fasi seguenti fino ad aver creato tutti gli account.

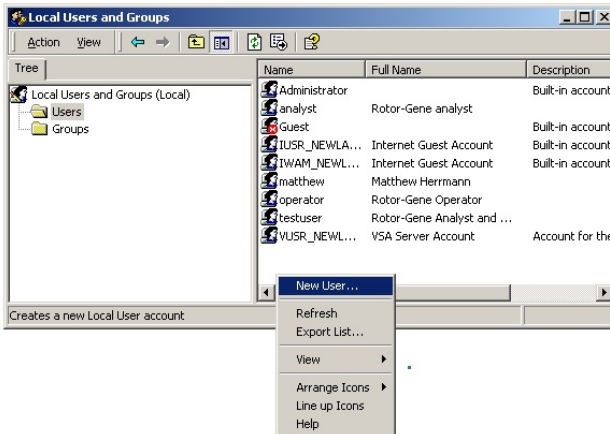
1. Per creare un nuovo utente, selezionare "Start/Settings/Control Panel" (Start/Impostazioni/Pannello di controllo).
2. Fare doppio clic su "Users and Passwords" (Utenti e password).



3. Nella scheda "Advanced", fare clic sul pulsante "Advanced".



4. Nella finestra visualizzata, selezionare la cartella "Users" (Utenti). Cliccare con il pulsante destro sulla finestra di destra e selezionare "New User" (Nuovo utente).



5. Immettere il nome utente e la password. Per default, l'utente sarà creato con privilegi d'accesso normali. Questo significa che potrà usare il software, ma non installare nuovi programmi, nè cambiare impostazioni del sistema.

The screenshot shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: xxxx
- Confirm password: xxxx
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Create, Close

6. Cliccare su "Create" (Crea). Ora si può eseguire il login come questo utente.

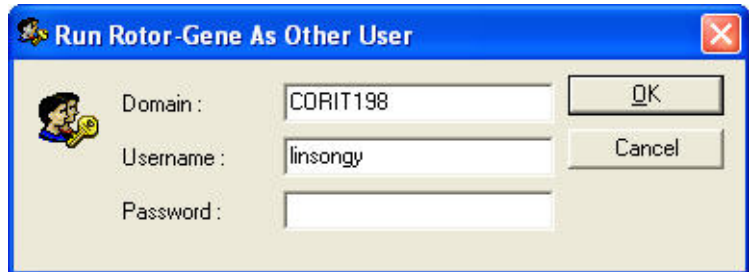
Assegnazione di ruoli ad ogni utente

Ora si dovrebbero assegnare ruoli ad ogni utente. L'accesso è diviso nelle seguenti aree:

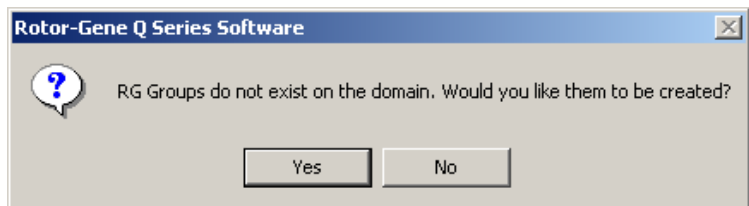
- Operatore Rotor-Gene Q — può eseguire processi, ma non generare report o eseguire analisi
- Analista Rotor-Gene Q — può analizzare i dati di processo e generare report, ma non eseguire nuovi processi
- Operatore e analista Rotor-Gene Q — può svolgere entrambi i ruoli
- Amministratore — può sbloccare i nomi dei campioni ed eseguire tutte le operazioni di analisti e operatori
- Nessuno — l'accesso al software è negato

Per assegnare i ruoli:

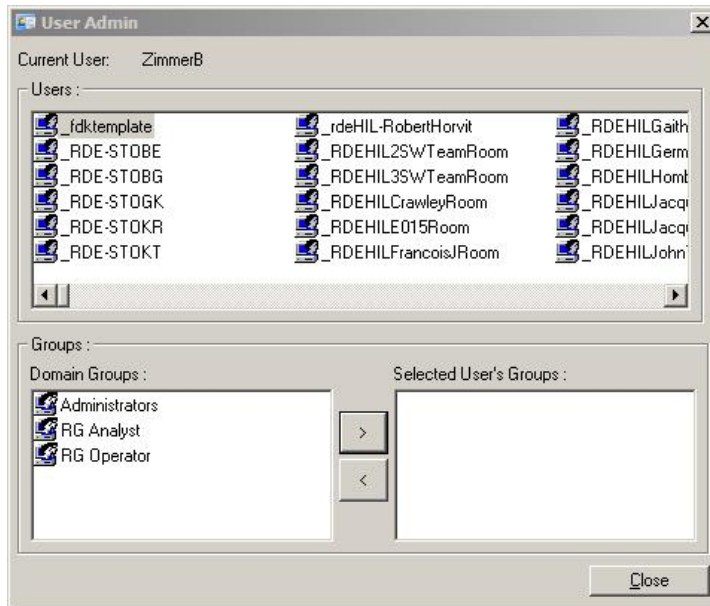
1. Eseguire il login in Windows come amministratore, oppure usare l'icona "Rotor-Gene Q Software Login" (Login software Rotor-Gene Q) per aprire il software ed effettuare il login.



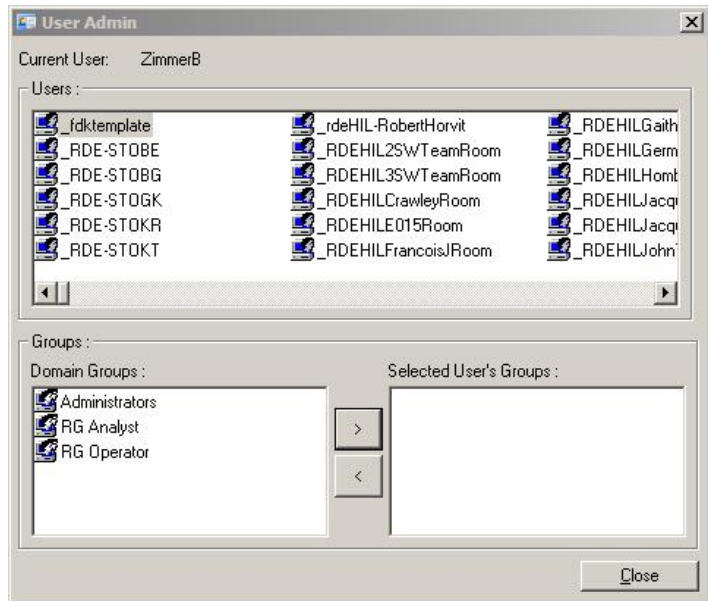
2. Una volta aperto il software, cliccare sul menu "Security". La prima volta che si accede al menu "Security", il software Rotor-Gene Q configura diversi gruppi di sistema che controlleranno l'accesso al software.



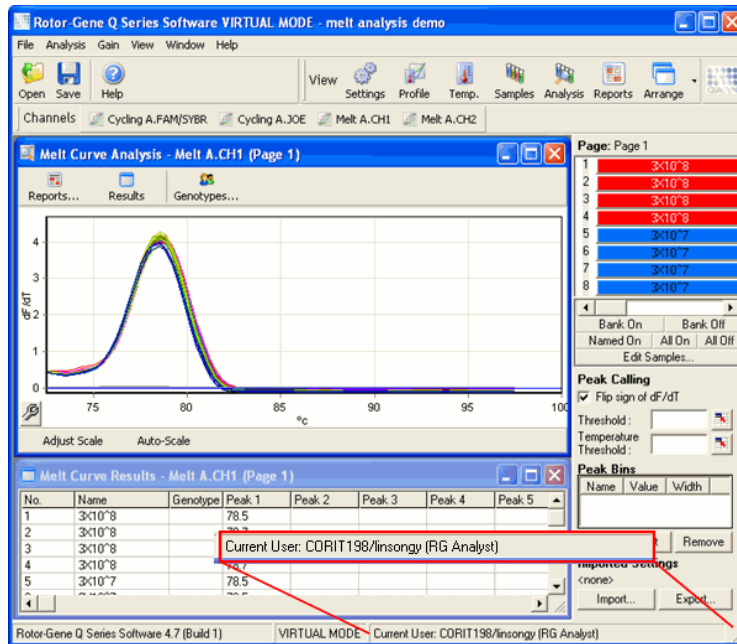
3. Cliccare su "Yes". Si apre la finestra "User Admin" (Amm. utenti). Nel pannello in alto sono visualizzati tutti gli utenti del computer. Alcuni account sono utilizzati dal sistema, quindi non sono familiari. Il riquadro in basso mostra i gruppi assegnati all'utente.



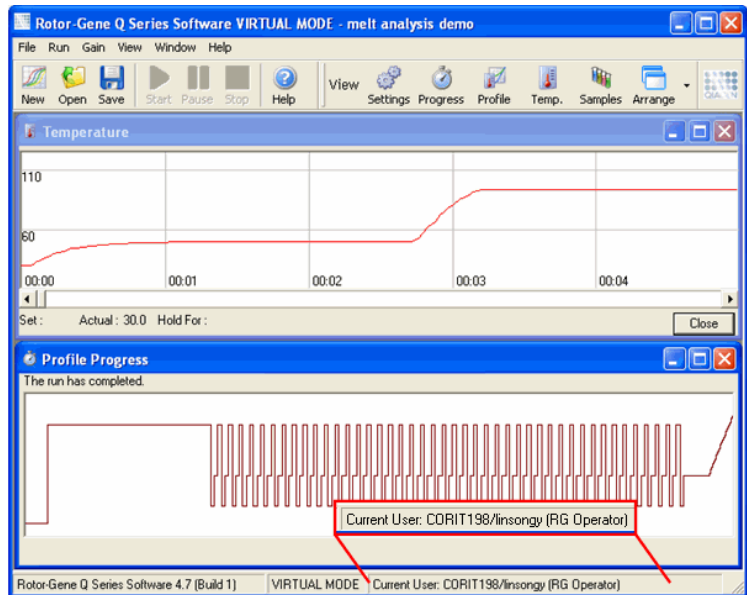
4. Per assegnare un gruppo a un utente, selezionare il nome dell'utente dalla lista. Il riquadro in basso viene aggiornato. Se l'utente non ha nessun gruppo, non può lanciare il software. Nell'esempio sottostante, assegniamo l'utente "linsongy" al gruppo "RG Analyst" selezionando il gruppo sul lato sinistro, poi cliccando sul pulsante ">". I gruppi possono essere rimossi selezionandoli, poi cliccando sul pulsante "<".



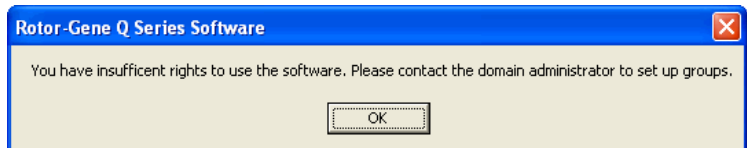
5. Eseguire ora il login come questo utente. In quanto "RG Analyst", il menu "Run" e il pulsante "Profile" (Profilo) non sono disponibili. È invece possibile aprire e analizzare file esistenti, come mostrato dalla schermata seguente. La barra di stato indica che l'utente "linsongy" è un "RG Analyst".



6. Eseguendo nuovamente il login come amministratore, si possono assegnare i diritti di "RG Operator" a "linsongy" e si può rilanciare il software. Questa volta mancano il menu "Analysis" e il pulsante "Reports", mentre è abilitato il menu "Run".
7. La barra di stato indica che l'utente "linsongy" appartiene al gruppo "RG Operator".



8. Se si esegue il login come amministratore e si rimuovono tutti i gruppi dall'utente "linsongy", compare il seguente messaggio quando "linsongy" apre il software.



7.9.2 Configurazione per Windows 7

Questa sezione descrive il modo di impostazione del sistema per gestire in sicurezza il software Rotor-Gene Q.

Per utilizzare le funzioni di sicurezza, il software deve essere installato con l'opzione "Force authentication through Windows domain". Questa richiede al dominio Windows il livello di accesso e le credenziali ed è essenziale per le funzioni di trasparenza e sicurezza.

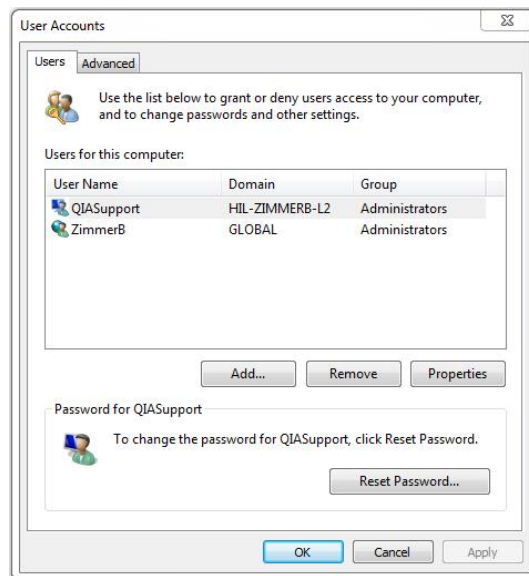
Gestione come amministratore

Molti utenti gestiscono il proprio computer come amministratori, senza password. Sebbene questo sia comodo, rende però impossibile determinare chi usi il computer. Questo elimina la trasparenza e impedisce l'attivazione di molte misure di sicurezza del software Rotor-Gene Q. Quando si gestisce come amministratori, sono abilitate tutte le funzioni del software. Pertanto la gestione come amministratore assicura che tutti gli utenti che non hanno bisogno delle funzioni di sicurezza possano accedere a tutte le funzioni del software.

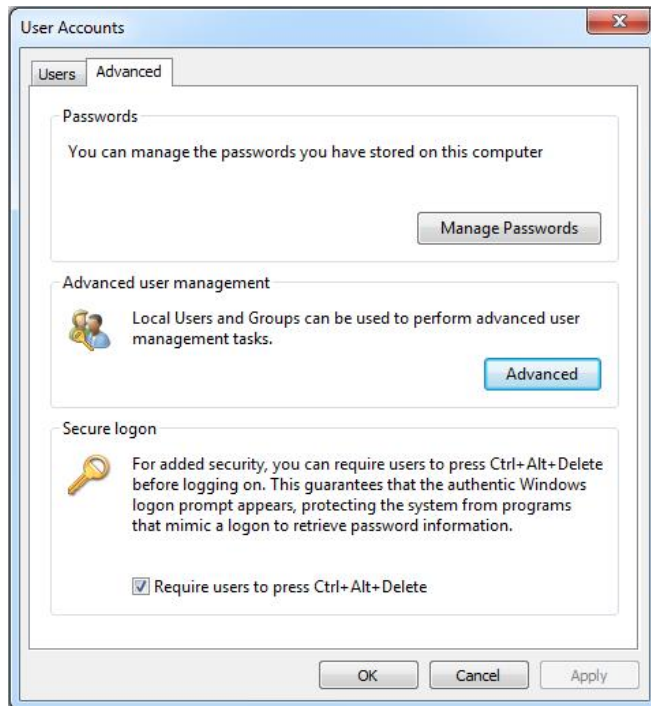
Creazione di un nuovo account utente

Crea un account per ogni utente del software. Per ogni utente ripetere le fasi seguenti fino ad aver creato tutti gli account.

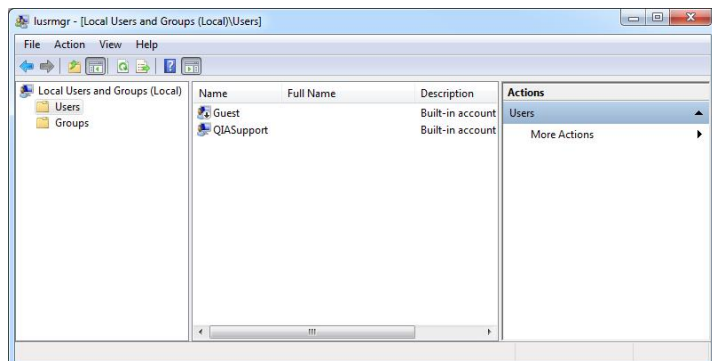
1. Per creare un nuovo utente, selezionare "Start/Settings/Control Panel".
2. Fare doppio clic su "Users and Passwords".



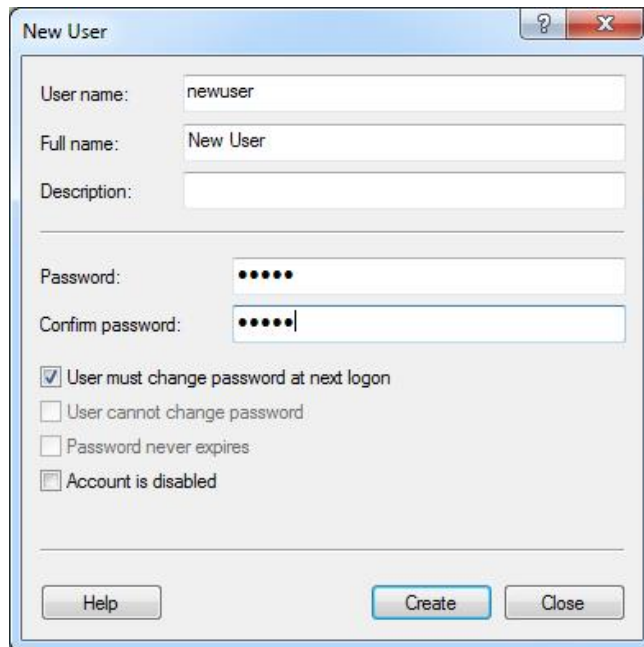
3. Nella scheda "Advanced", fare clic sul pulsante "Advanced".



4. Nella finestra visualizzata, selezionare la cartella "Users". Cliccare con il pulsante destro sulla finestra di destra e selezionare "New User".



5. Immettere il nome utente e la password. Per default, l'utente sarà creato con privilegi d'accesso normali. Questo significa che potrà usare il software, ma non installare nuovi programmi, né cambiare impostazioni del sistema.



The screenshot shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

- User name: newuser
- Full name: New User
- Description: (empty)
- Password: (masked with 6 dots)
- Confirm password: (masked with 6 dots)
- User must change password at next logon
- User cannot change password
- Password never expires
- Account is disabled

Buttons: Help, Create, Close

6. Cliccare su "Create". Ora si può eseguire il login come questo utente.

Assegnazione di ruoli ad ogni utente

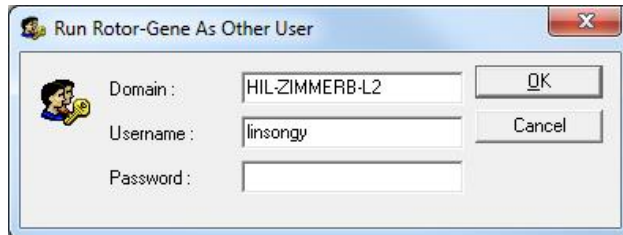
Ora si dovrebbero assegnare ruoli ad ogni utente. L'accesso è diviso nelle seguenti aree:

- Operatore Rotor-Gene Q — può eseguire processi, ma non generare report o eseguire analisi
- Analista Rotor-Gene Q — può analizzare i dati di processo e generare report, ma non eseguire nuovi processi
- Operatore e analista Rotor-Gene Q — può svolgere entrambi i ruoli

- Amministratore — può sbloccare i nomi dei campioni ed eseguire tutte le operazioni di analisti e operatori
- Nessuno — l'accesso al software è negato

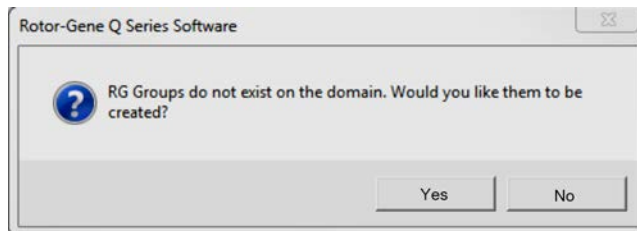
Per assegnare i ruoli:

1. Eseguire il login in Windows come amministratore, oppure usare l'icona "Rotor-Gene Q Software Login" per aprire il software ed effettuare il login.

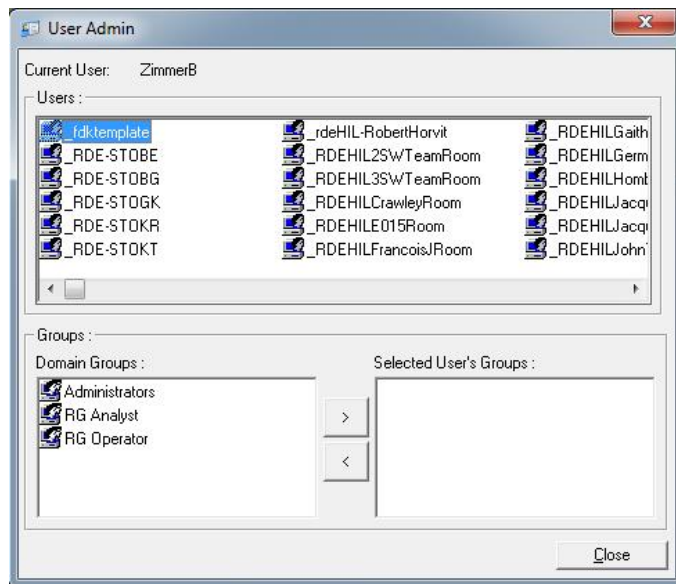


Nota: Per creare i Gruppi RG con il software Rotor-Gene Q è necessario eseguire il software con diritti di amministratore. A tal fine, cliccare con il pulsante destro sull'icona presente sul desktop e selezionare "Run as administrator" (Gestisci come amministratore) nel menu contestuale.

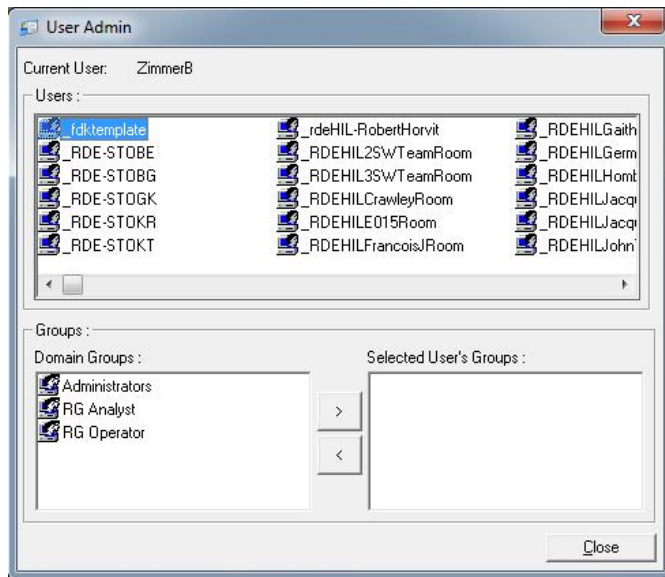
2. Una volta aperto il software, cliccare sul menu "Security". La prima volta che si accede al menu "Security", il software Rotor-Gene Q configura diversi gruppi di sistema che controlleranno l'accesso al software.



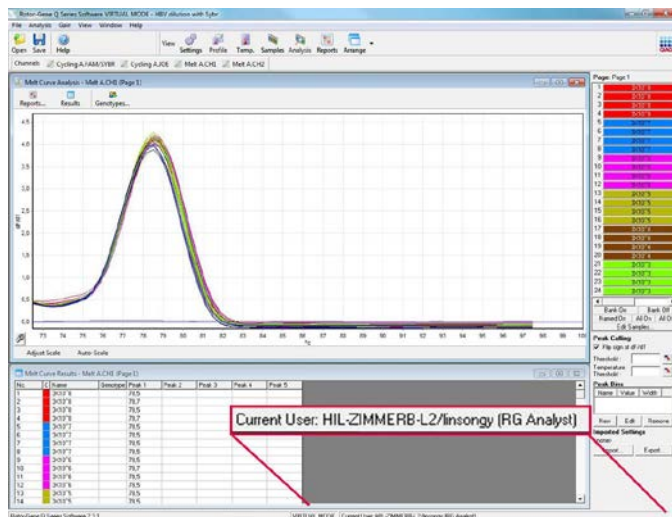
3. Cliccare su "Yes". Si apre la finestra "User Admin". Nel pannello in alto sono visualizzati tutti gli utenti del computer. Alcuni account sono utilizzati dal sistema, quindi non sono familiari. Il riquadro in basso mostra i gruppi assegnati all'utente.



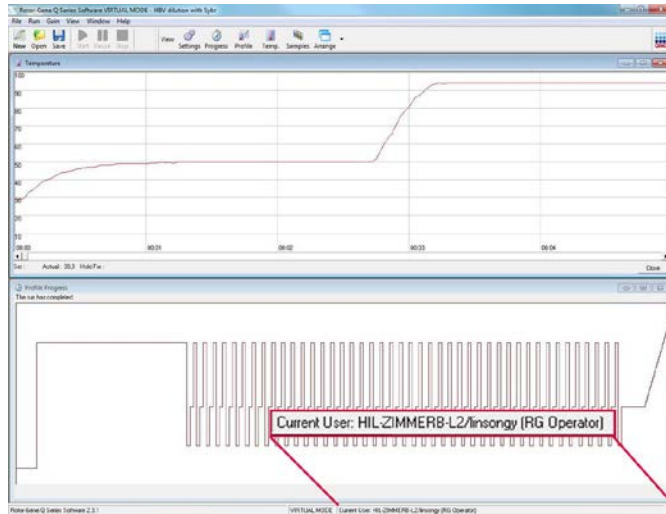
4. Per assegnare un gruppo a un utente, selezionare il nome dell'utente dalla lista. Il riquadro in basso viene aggiornato. Se l'utente non ha nessun gruppo, non può lanciare il software. Nell'esempio sottostante, assegniamo l'utente "linsongy" al gruppo "RG Analyst" selezionando il gruppo sul lato sinistro, poi cliccando sul pulsante ">". I gruppi possono essere rimossi selezionandoli, poi cliccando sul pulsante "<".



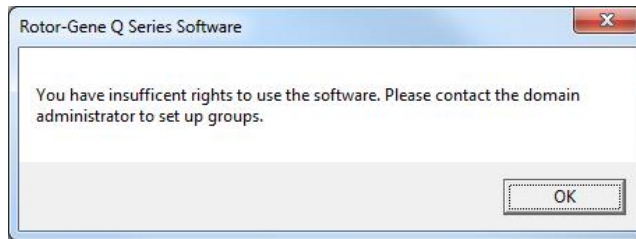
- Eseguire ora il login come questo utente. In quanto "RG Analyst", il menu "Run" e il pulsante "Profile" non sono disponibili. È invece possibile aprire e analizzare file esistenti, come mostrato dalla schermata seguente. La barra di stato indica che l'utente "linsongy" è un "RG Analyst".



6. Eseguendo nuovamente il login come amministratore, si possono assegnare i diritti di "RG Operator" a "linsongy" e si può rilanciare il software. Questa volta mancano il menu "Analysis" e il pulsante "Reports", mentre è abilitato il menu "Run". La barra di stato indica che l'utente "linsongy" appartiene al gruppo "RG Operator".



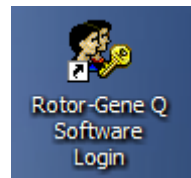
7. Se si esegue il login come amministratore e si rimuovono tutti i gruppi dall'utente "linsongy", compare il seguente messaggio quando "linsongy" apre il software.



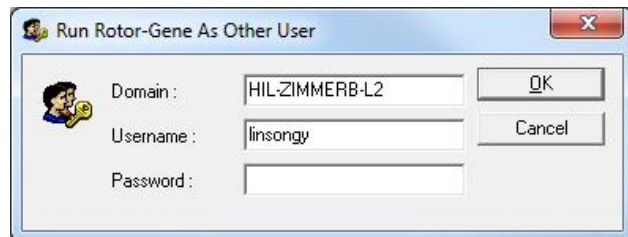
7.9.3 Gestione di più utenti sullo stesso computer

Per usare il software Rotor-Gene Q con più utenti, creare un account utente che non abbia accesso al software Rotor-Gene Q. Eseguire il login in Windows mediante questo account, in modo che gli utenti non possano accedere al Rotor-Gene Q MDx in forma anonima.

1. Usando l'icona "Rotor-Gene Q Software Login", gli utenti possono aprire il loro account utenti nel software Rotor-Gene Q.



2. Immettere il nome utente e la password nella finestra visualizzata.



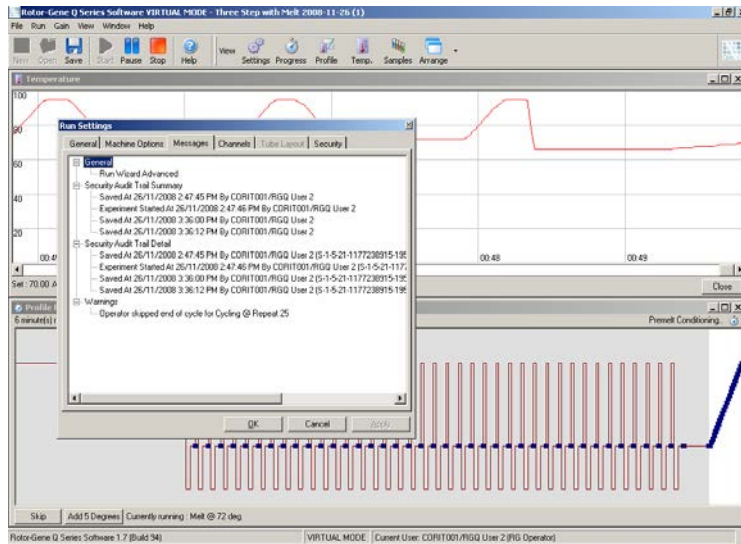
3. Il dominio è il computer a cui si sta accedendo o il nome della rete locale. Consultare il proprio amministratore di rete se non si è sicuri di quale dominio inserire in questo campo.

Nota: Dopo il login, tutti i file dell'utente saranno disponibili per quell'utente. Ogni utente può salvare file nella propria area. Questo garantisce un alto livello di sicurezza.

Nota: Ogni utente dovrebbe eseguire il logout una volta completati i propri processi, per evitare che altri utenti eseguano processi a suo nome.

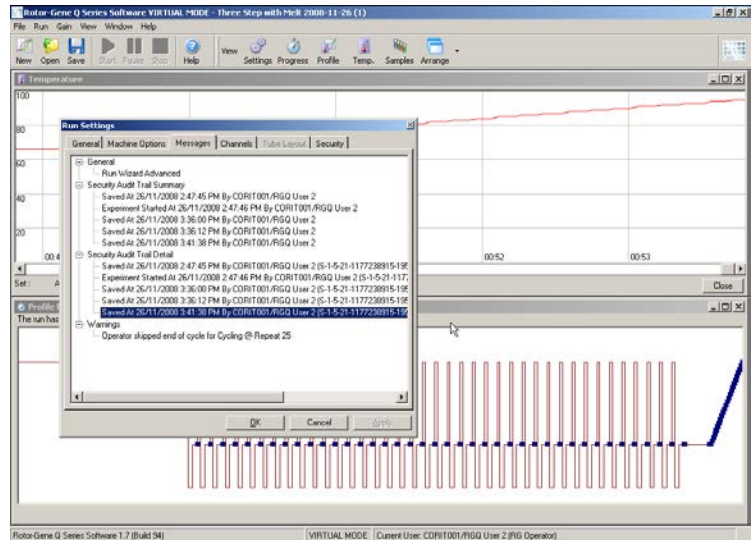
7.9.4 "Audit trail"

Ogni volta che un file è salvato da un utente, i dettagli relativi sono registrati in "Run Settings" sotto la scheda "Messages" (Messaggi) come "Security Audit Trail Summary" (Sommario audit trail sicurezza) e "Security Audit Trail Detail" (Dettaglio audit trail sicurezza).



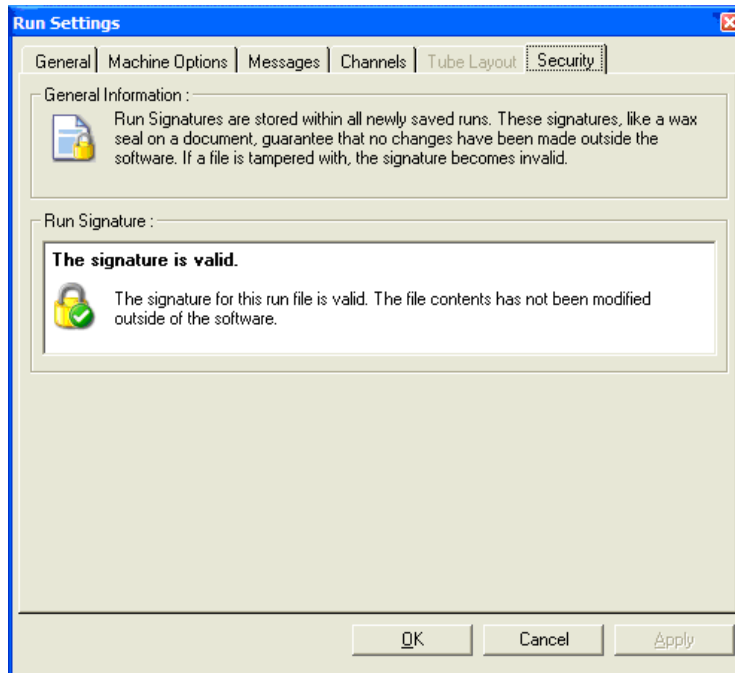
La funzione può essere usata per monitorare chi ha modificato il contenuto di un file. "Security Audit Trail Detail" contiene maggiori dettagli, quali l'identificatore unico dell'utente. Questo identificatore è importante per evitare che un utente crei un account con lo stesso nome su un altro computer così impersonando un altro utente. In questo caso, il nome degli utenti sarebbe lo stesso, ma le ID dell'account saranno diverse.

L'identificatore per l'account "CORIT001/RGQ User 2, S-1-5-21-1177238915-195", è visualizzato nei dettagli.

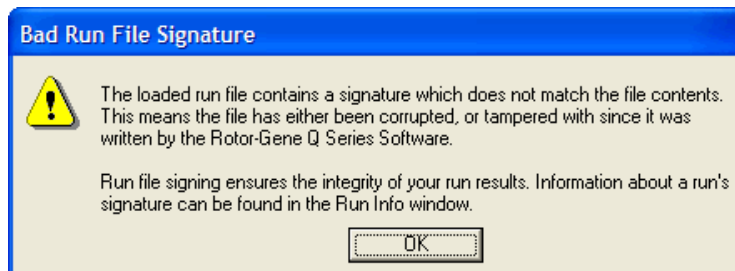


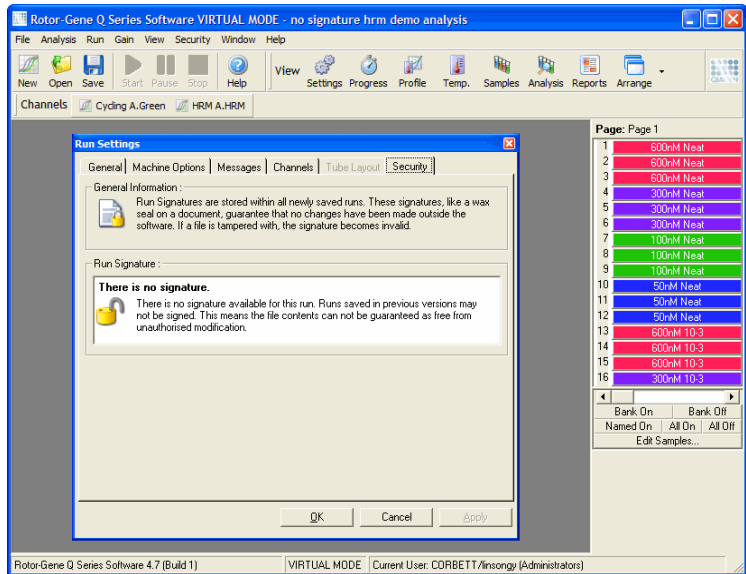
7.9.5 Firme dei processi

L'audit trail è memorizzato nel file di processo Rotor-Gene Q. Per evitare ogni modifica indesiderata a questi file, bisognerebbe tenerli in una posizione sicura accessibile solo agli account di Windows designati. Se invece i file sono conservati in un'area condivisa, "Run Signatures" (Firme dei processi) dà una sicurezza in più. La schermata presenta la scheda "Security" in "Run Settings" per un file con una "Run Signature".



La "Run Signature" è una parola molto lunga, generata ogni volta che si salva il file e legata al contenuto del file. Per esempio, la firma di questo file è "517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081". Se il file viene aperto in Blocco Note e si apporta una modifica (per es. si cambia la data del processo a 3 giorni prima), riaprendo il file compare il seguente messaggio.





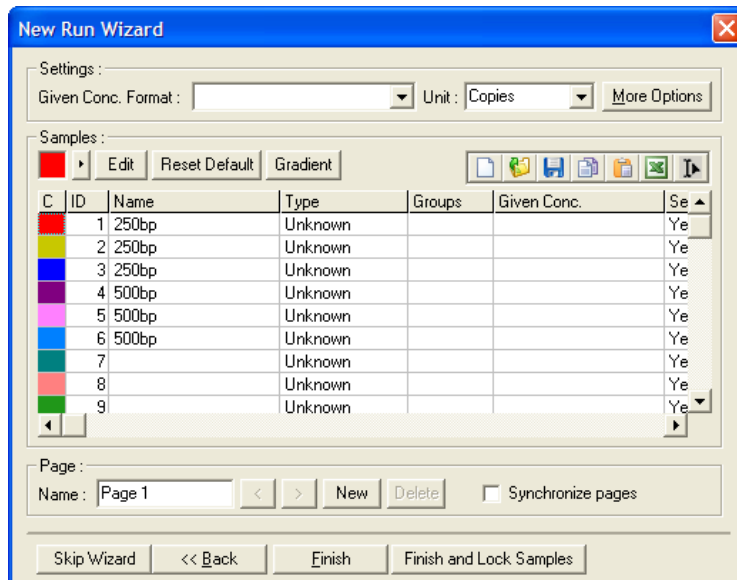
Nota: Se si inviano i file per e-mail, il processo di criptazione può invalidare la firma. Per evitarlo, zippare il file prima di spedirlo per e-mail.

7.9.6 Bloccaggio campioni

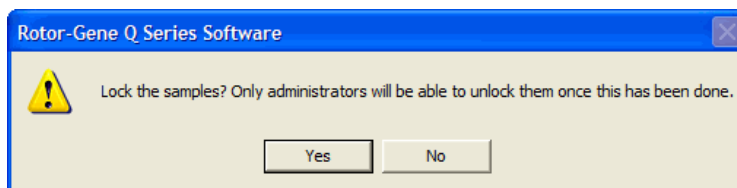
È importante assicurarsi che i nomi dei campioni non siano cambiati accidentalmente o intenzionalmente una volta che un utente ha avviato un processo. Per questo motivo il software Rotor-Gene Q prevede il bloccaggio dei campioni. I nomi dei campioni possono essere bloccati da qualsiasi utente, ma possono essere sbloccati solo da un amministratore. Per gli utenti che gestiscono il loro computer in modo amministratore, questa opzione ha valore limitato. Per utilizzare questa opzione, il computer deve essere configurato in modo sicuro come descritto nelle sezioni precedenti.

Nota: Se si desidera bloccare i campioni, non gestire il software come amministratore. Creare un account con i gruppi "RG Operator" e "RG Analyst" e mantenere segreta la password dell'amministratore. Per sbloccare i file gli utenti avranno così bisogno dell'autorizzazione dell'amministratore.

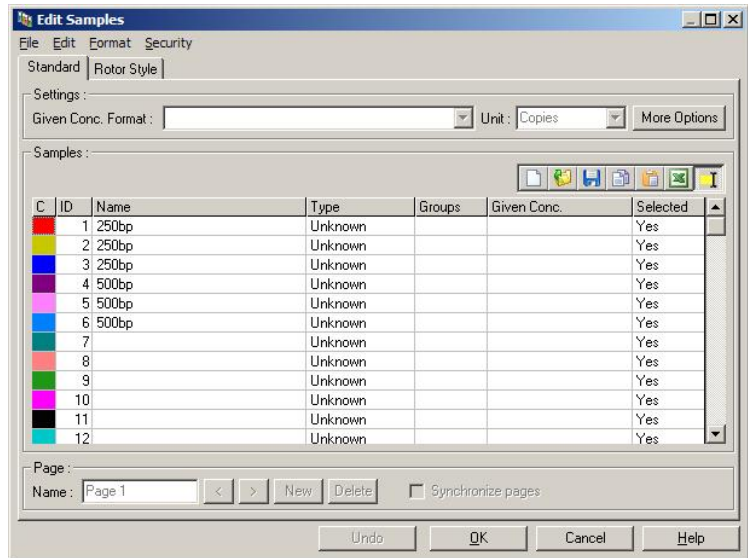
I campioni possono essere bloccati prima di iniziare un processo quando si usa la procedura guidata “Advanced” cliccando su “Finish and Lock Samples”.



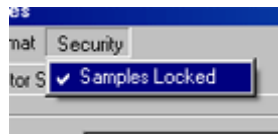
Sarà visualizzato il seguente avviso. Cliccare “Yes” per confermare.



Una volta bloccati i campioni, non è più possibile modificarli nella finestra “Edit Samples”.



I gruppi possono essere anche bloccati e sbloccati nella finestra "Edit Samples". Tuttavia solo un amministratore può sbloccare i campioni dopo che sono stati bloccati.

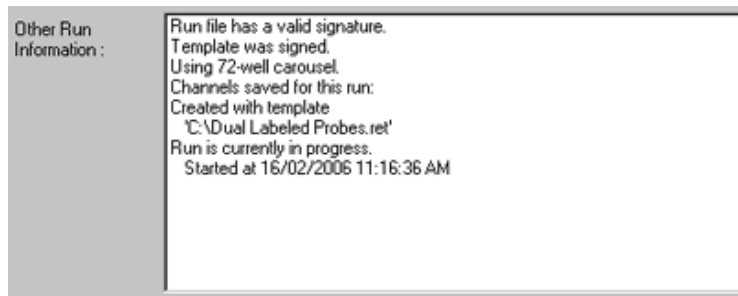


Qualsiasi modifica non autorizzata al file invalida la firma del processo.

7.9.7 Modelli bloccati

Attualmente non è possibile all'utente creare file modello di sola lettura con il software Rotor-Gene Q. Se però lo desidera, può specificare come requisito che tutti i processi siano eseguiti con uno specifico file modello. Per assicurare l'accesso in sola lettura al modello, questo deve essere salvato su un drive di rete in cui gli utenti non possano modificare i dati. Gli utenti potranno comunque usare e modificare i loro profili personali, mentre il modello in un drive di questo genere rimane protetto. Per tenere traccia di

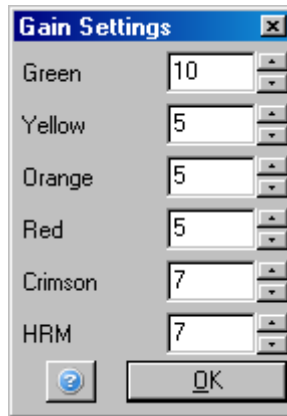
quale modello sia stato usato, il software Rotor-Gene Q salva il nome del file modello che è stato utilizzato. Questa informazione può essere ottenuta cliccando sul pulsante "Settings" (Impostazioni) che permette di visualizzare la finestra "Run Settings". Le informazioni sul modello sono salvate in "Other Run Information" (Altre informazioni sul processo).



7.10 Menu "Gain"

Cliccare sul menu "Gain" per visualizzare le "Gain Settings" (Impostazioni gain) per il processo corrente. Si imposta così il gain del canale specificato prima di un processo. Le impostazioni del gain vengono conservate dall'ultimo processo. Tali impostazioni possono essere modificate se il processo non è ancora iniziato o è nei cicli iniziali. Usare le frecce alto/basso accanto a ogni campo di testo per modificare i campi. Poi fare clic su "OK".

Il gain può essere cambiato durante i cicli iniziali. Nel canale appropriato sarà tracciata una linea rossa per mostrare dove è stato cambiato il gain. I cicli prima del cambiamento saranno esclusi dall'analisi.

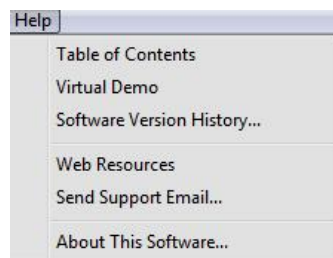


7.11 Menu "Window"

Questo menu permette di ordinare le finestre in senso orizzontale o verticale, oppure a cascata. Sono accessibili altre opzioni cliccando sulla freccia a destra del pulsante "Arrange".

7.12 Funzione "Help"

Quando si utilizza il pulsante "Help" o il menu "Help", si apre il seguente menu a tendina.



"Table of Contents"
(Indice)

Consente di accedere alla funzione Help.

“Virtual Demo” (Demo virtuale)	Consente di collegarsi una pagina Web QIAGEN con una dimostrazione interattiva del software.
“Software Version History...” (Cronologia versioni software)	Fornisce una breve panoramica delle nuove funzioni aggiunte rispetto alla versione del software installata in precedenza.
“Web Resources” (Risorse web)	Apri una pagina Web QIAGEN in una nuova finestra del browser contenente le più recenti informazioni sugli strumenti Rotor-Gene Q MDx e sui relativi reagenti.
“About This Software...” (Informazioni sul software)	Fornisce informazioni sulla macchina collegata, sul numero di matricola del Rotor-Gene Q MDx e sulla versione del software.

7.12.1 Invio e-mail per supporto

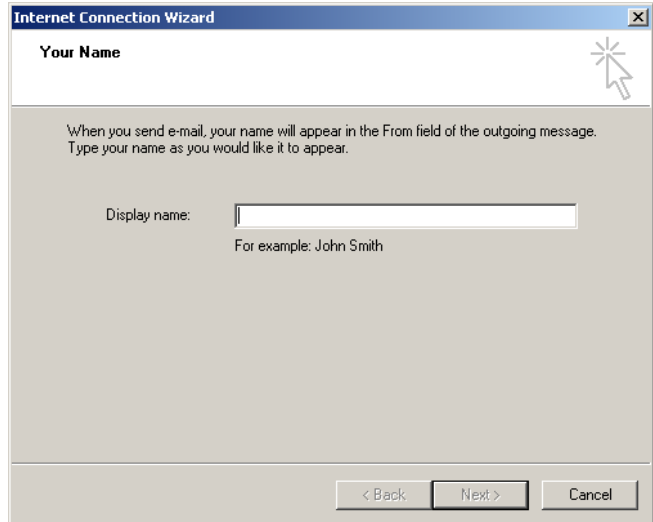
L'opzione "Send Support Email" (Invio e-mail per supporto) del menu "Help" permette l'invio di una e-mail di supporto a QIAGEN comprendente tutte le informazioni importanti di un processo. L'opzione "Save As" salva tutte le informazioni in un file che è possibile copiare su un disco o in una rete se non si ha accesso all'e-mail sul computer che gestisce il Rotor-Gene Q MDx.

Se si utilizza la funzione e-mail per supporto sul notebook fornito su richiesta con il Rotor-Gene Q MDx (a seconda del paese), la prima volta è necessario configurare le impostazioni di posta elettronica.

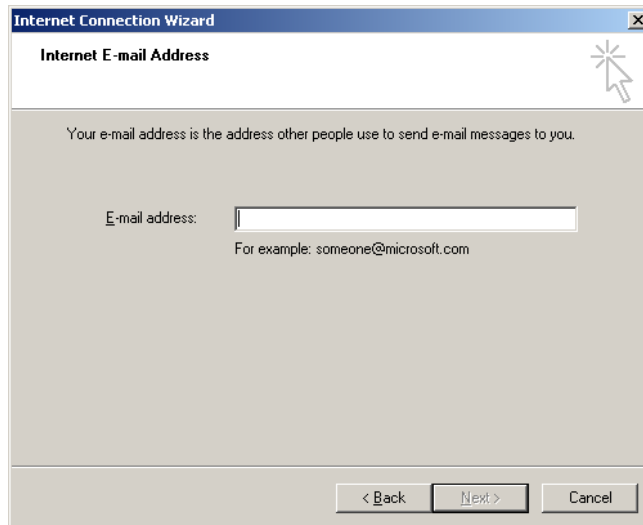
Nota: È possibile eseguire gli inserimenti del manager IT della propria azienda.

Configurazione delle impostazioni di posta elettronica

Cliccare sull'opzione "Send Support Email...". Si apre la seguente finestra.

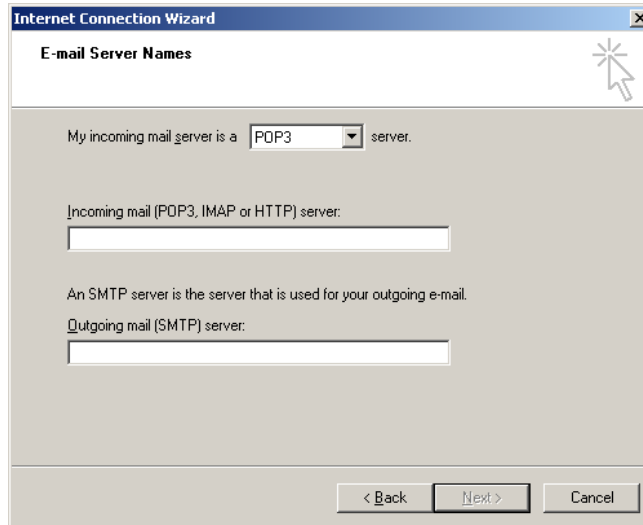


1. Digitare il proprio nome e cliccare "Next". Si apre la finestra "Internet E-mail Address" (Indirizzo di posta elettronica di Internet).



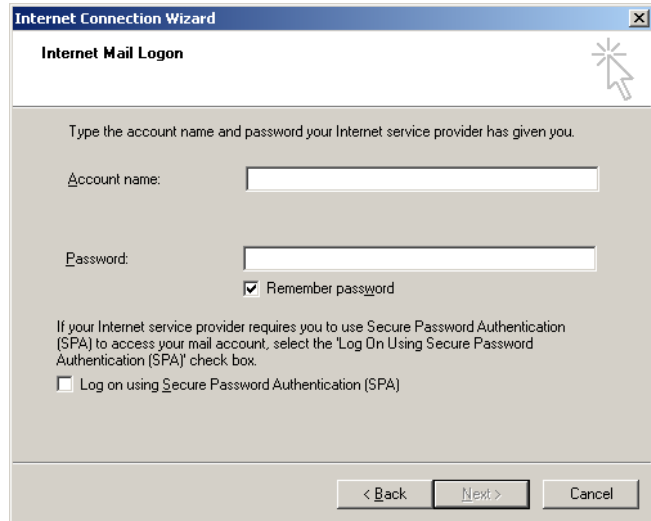
The screenshot shows a window titled "Internet Connection Wizard" with a close button (X) in the top right corner. The main title is "Internet E-mail Address". Below the title is a mouse cursor icon. The text reads: "Your e-mail address is the address other people use to send e-mail messages to you." There is a text input field labeled "E-mail address:" with a placeholder example "For example: someone@microsoft.com". At the bottom, there are three buttons: "< Back", "Next >", and "Cancel".

2. Digitare il proprio indirizzo di posta elettronica e premere "Next". Si apre la finestra "E-mail Server Names" (Nomi server di posta elettronica).

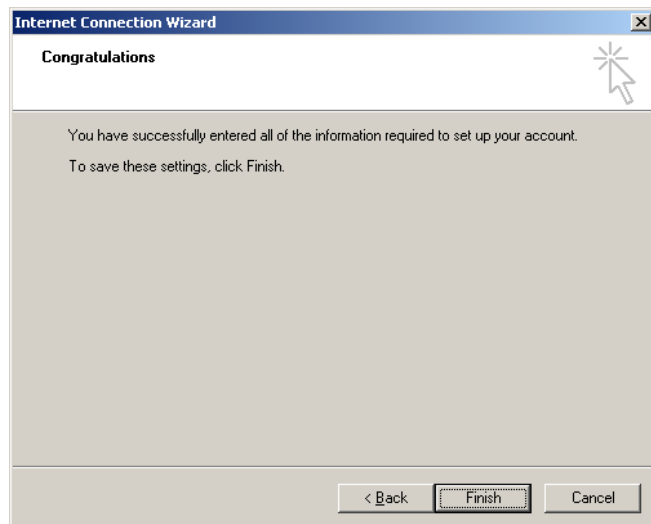


The screenshot shows a window titled "Internet Connection Wizard" with a close button (X) in the top right corner. The main title is "E-mail Server Names". Below the title is a mouse cursor icon. The text reads: "My incoming mail server is a POP3 server." There is a dropdown menu showing "POP3" and a text input field for the "Incoming mail (POP3, IMAP or HTTP) server:". Below that, it says: "An SMTP server is the server that is used for your outgoing e-mail." There is a text input field for the "Outgoing mail (SMTP) server:". At the bottom, there are three buttons: "< Back", "Next >", and "Cancel".

3. Selezionare il tipo di server di posta elettronica per le mail in arrivo e specificare i nomi dei server per le e-mail in arrivo e in partenza. Poi premere "Next". Si apre la finestra "Internet Mail Logon" (Logon a posta Internet).



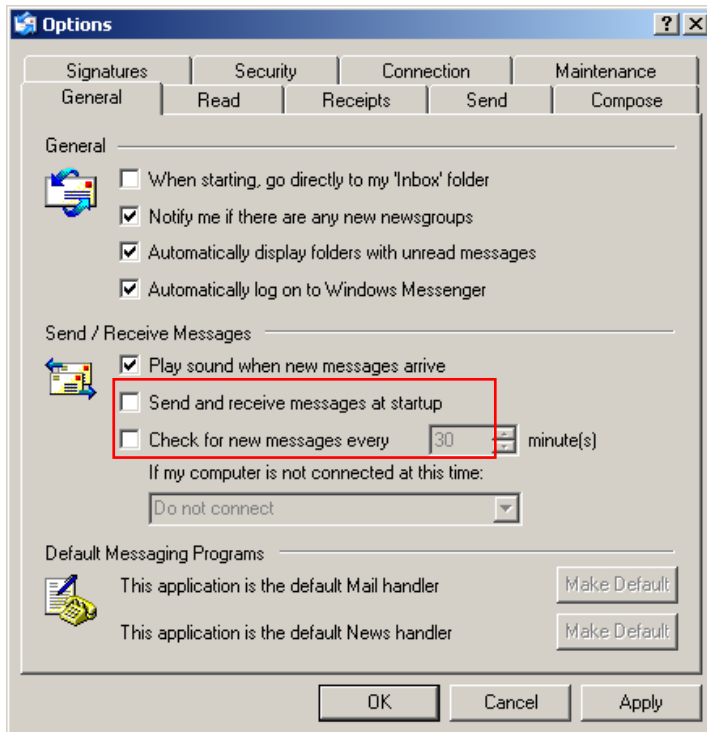
4. Digitare il proprio nome account di posta elettronica e la password, se il proprio server utilizza l'autenticazione di sicurezza con password. Poi cliccare "Next". Si apre la finestra "Congratulations" (Complimenti).



5. Confermare con "Finish" (Termina) per completare la configurazione dell'account di posta elettronica.

Configurazione in Outlook

1. Aprire "Outlook Express" dal menu Start (Start, All programs, Outlook Express (Avvio, Tutti i programmi, Outlook Express)).
2. Selezionare Tools (Strumenti) e poi Options (Opzioni). Si apre la finestra sotto riportata.



Importante: Per evitare il recupero di e-mail durante i processi PCR, disabilitare le voci predefinite nella schermata "Send/Receive Messages" (Invia/ricevi messaggi).

3. Disabilitare "Send and receive messages at startup" (Inviare e ricevere messaggi all'avvio).
4. Disabilitare "Check for new messages every 30 minutes" (Verifica arrivo nuovi messaggi ogni 30 minuti).
5. Confermare le modifiche con "OK".

8 Funzioni aggiuntive

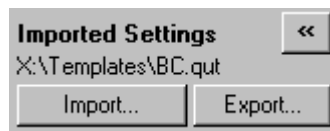
8.1 Modelli di analisi

Alcune analisi esigono che l'utente definisca soglie, impostazioni di normalizzazione e di genotipo. Spesso queste impostazioni sono riutilizzate in esperimenti multipli.

I modelli di analisi permettono all'utente di salvare e riutilizzare queste impostazioni. Si riduce così la necessità di reimmettere le impostazioni e quindi il rischio di errori.

Le analisi "Quantitation", "Melt", "Allelic discrimination", "Scatter graph" ed EndPoint supportano modelli di analisi. Queste analisi permettono all'utente di esportare un modello esclusivo per l'analisi (per es. l'analisi "Quantitation analysis" permette esportazione e importazione di file *.qut contenenti impostazioni quantitative).

Dopo esportazione o importazione di un modello di analisi, il nome del file del modello resta visualizzato come riferimento.



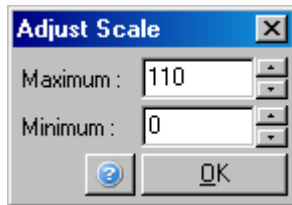
8.2 Apertura di un secondo processo

Mentre si esegue un processo, è possibile aprire e analizzare i processi eseguiti in precedenza. Nella seconda finestra sono disattivate diverse funzioni, fra cui i pulsanti "New" o "Start Run". Si può lanciare un secondo processo dalla prima finestra una volta terminato il primo.

8.3 Opzioni di scala

Per accedere a "Adjust Scale", cliccare su "Adjust Scale..." in basso nella finestra principale oppure cliccare con il tasto destro sul grafico e selezionare "Adjust Scale..." dal menu

visualizzato. Si può immettere manualmente una scala nella finestra così visualizzata.



Per accedere a "Auto-Scale" (Scala automatica), cliccare su "Auto-Scale..." in basso nella finestra principale oppure cliccare con il tasto destro sul grafico e selezionare "Auto-Scale..." dal menu visualizzato. "Auto-Scale" tenta di adattare la scala ai valori massimi e minimi dei dati.

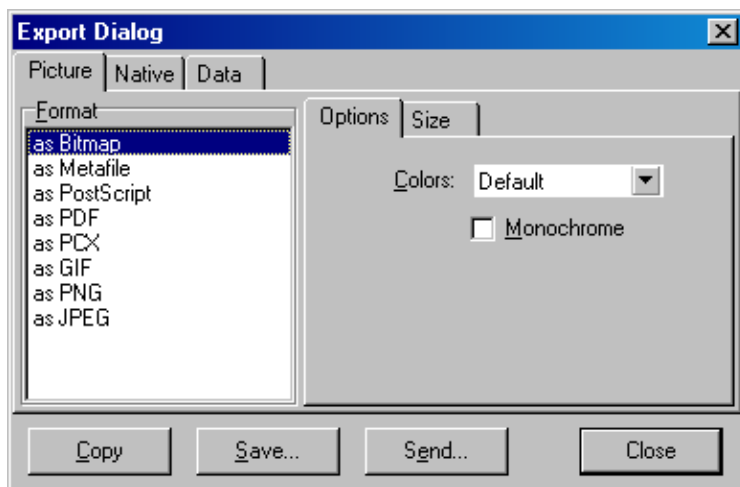
Per accedere a "Default Scale", cliccare su "Default Scale..." in basso nella finestra principale oppure cliccare con il tasto destro sul grafico e selezionare "Default Scale..." dal menu visualizzato. "Default Scale" resetta la scala di visualizzazione da 0 a 100 unità di fluorescenza.

8.4 Esportazione di grafici

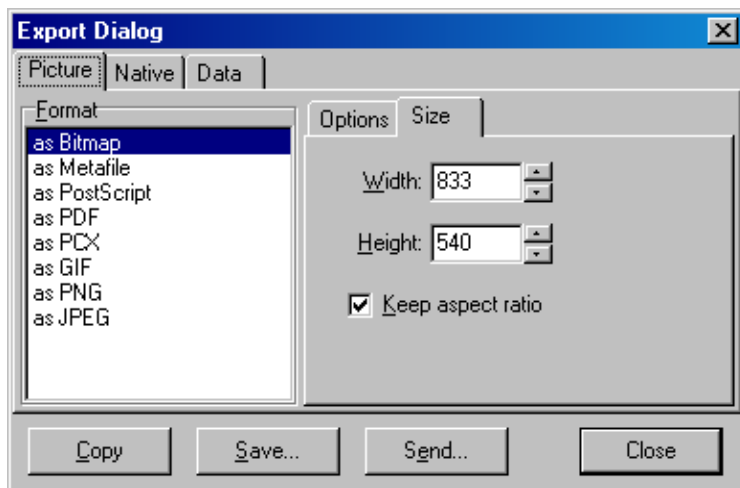
Esportazione di immagini

Le fasi seguenti descrivono come salvare un'immagine.

1. Fare clic con il pulsante destro sull'immagine e selezionare "Export" dal menu visualizzato.
2. Si apre la finestra "Export Dialog" (Dialogo export). Selezionare il formato desiderato dall'elenco "Format".



3. Selezionare la scheda "Size" (Dimensioni) e specificare le misure desiderate.



4. Selezionare la casella "Keep aspect ratio" (Mantenere proporzioni) per mantenere le proporzioni corrette nel ridimensionamento.
5. Cliccare su "Save" e selezionare un nome e una posizione per il file nella finestra di dialogo visualizzata.

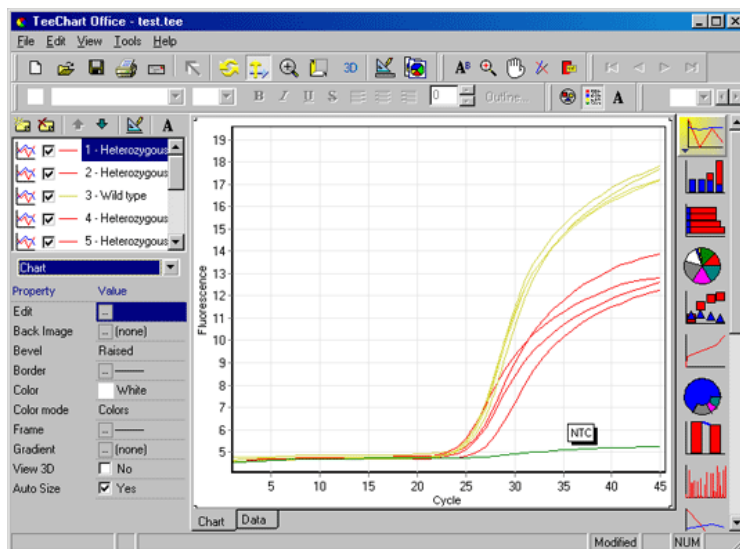
Se è richiesta un'immagine ad alta risoluzione, consigliamo di aumentare le dimensioni dell'immagine fino a soddisfare le proprie esigenze oppure di salvare il grafico come metafile (*.emf, *.wmf). Si tratta di un formato a base di vettori che può essere aperta da software quali Adobe® Illustrator® e che permette di creare immagini con qualsiasi risoluzione.

Esportazione in formato nativo

I grafici del software Rotor-Gene Q utilizzano la componente terza TeeChart® sviluppata dal software Steema. Per salvare un grafico in formato nativo, selezionare la scheda "Native" (Nativo) nella finestra "Export Dialog" (vedere schermata precedente) e poi cliccare su "Save". Il formato "Native" è il formato standard dei file TeeChart. Questo permette l'utilizzo di TeeChart Office dal software Steema. TeeChart Office è disponibile come freeware ed è installato come parte del pacchetto del software Rotor-Gene Q. Per accedere al software, cliccare sull'icona TeeChart sul desktop.

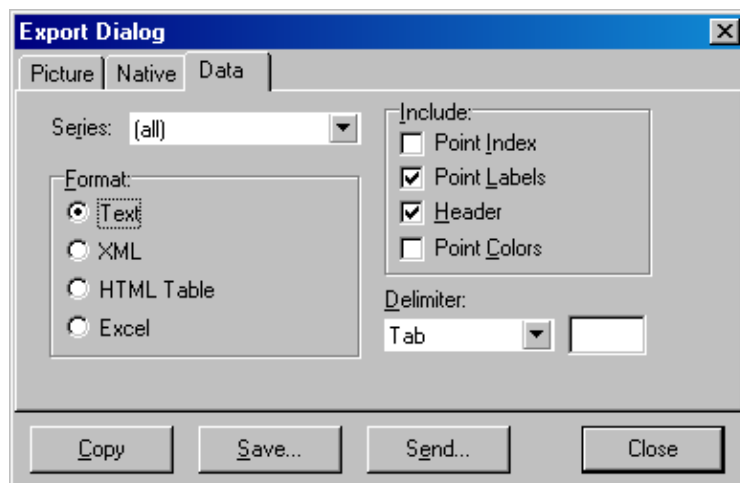


TeeChart Office permette di manipolare i grafici esportati, anche con cambio di colore delle curve, aggiunta di note, cambiamento di caratteri e spostamento dei punti dati.




Esportazione di dati

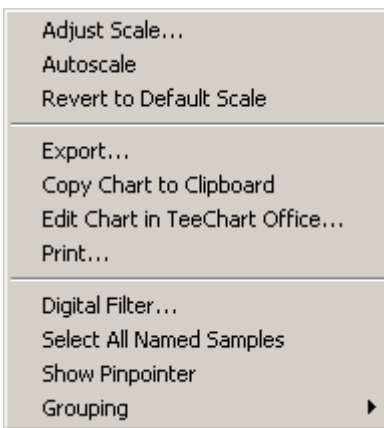
Per esportare dati in vari formati, selezionare la scheda "Data" (Dati) nella finestra "Export Dialog". Il file esportato contiene i punti dati grezzi usati nel grafico.



L'esportazione dei dati grezzi e di analisi può essere effettuata anche selezionando "Save As" nel menu "File" (vedere Sezione 7.5).

8.5 Icona chiave inglese

L'icona con la chiave inglese  è visualizzata in basso a sinistra nella finestra principale. Cliccando sull'icona con la chiave inglese si accede a diverse opzioni. Si può accedere a queste opzioni anche cliccando con il tasto destro sul grafico.



"Adjust Scale, Autoscale, Revert to Default Scale" (Torna a scala di default):

Vedere Sezione 8.3.

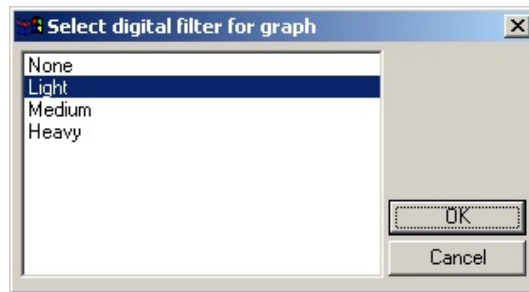
"Export...":

Salva il grafico in vari formati (vedere Sezione 8.4).

"Copy Chart to Clipboard" (Copia grafico in Appunti):

Copia negli Appunti l'immagine del grafico.

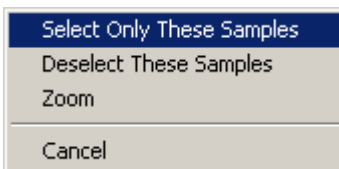
- “Edit Chart in TeeChart Office...” (Modifica il grafico in TeeChart Office): Apre il grafico direttamente in TeeChart Office per la modifica (vedere Sezione 8.4).
- “Print”:
- Stampa il grafico.
- “Digital Filter...” (Filtro digitale): Modifica il filtro digitale selezionato correntemente sul grafico. Il filtro digitale uniforma i dati mediante una finestra scorrevole di punti.



- “Show Pinpointer” (Mostra puntatore): Apre una finestra che visualizza le coordinate esatte della posizione del puntatore del mouse.
- “Grouping” (Raggruppa): Raggruppa visivamente i campioni con nome identico. Può essere utile per i processi con rotore al completo. La selezione di questa opzione non influisce sui valori calcolati.

8.6 Opzioni dell'area selezionata

Si può selezionare un'area di un grafico cliccando il tasto sinistro del mouse e trascinando il puntatore. Appaiono le seguenti opzioni.



“Select Only These Samples”
(Selezionare solo questi campioni):

I campioni esterni all'area selezionata vengono deselezionati.

“Deselect These Samples”
(Deselezionare questi campioni):

Tutti i campioni nell'area selezionata vengono deselezionati.

“Zoom”:

Esegue uno zoom sull'area selezionata del grafico. Cliccare sul pulsante “Default Scale” per zoomare all'indietro.

9 Procedure di manutenzione

È facile mantenere le prestazioni del Rotor-Gene Q MDx. Per mantenere le prestazioni ottiche, assicurarsi che siano pulite le lenti situate sia sulla fonte di emissione che su quella di rilevamento. Per ottenere questo risultato, passare delicatamente sulle lenti un bastoncino ovattato inumidito con etanolo o isopropanolo*.

Nota: Pulire le lenti almeno una volta al mese, a seconda della frequenza d'uso. Nella stessa occasione pulire la camera del rotore.

Mantenere l'area del banco da lavoro pulita e priva di polvere e fogli di carta. La presa d'aria del Rotor-Gene Q MDx si trova sul fondo e materiali quali la carta o la polvere possono ostruirla e compromettere le prestazioni.



Per evitare l'accumulo di polvere, tenere chiuso il coperchio del Rotor-Gene Q MDx quando lo strumento non è utilizzato.

Se la camera del rotore si contamina, può essere pulita passando sulle superfici un panno non filaccioso inumidito (ma ben strizzato) con una soluzione di candeggina allo

* Quando si lavora con solventi o sostanze tossiche volatili, si deve prevedere un sistema efficiente di ventilazione del laboratorio per eliminare i vapori eventualmente prodotti. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede tecniche di sicurezza (SDS), disponibili presso il fornitore del prodotto.

Procedure di manutenzione

0,1% (v/v).* Ripassare poi la camera con un panno non filaccioso inumidito con acqua di qualità PCR per rimuovere ogni traccia di candeggina.

10 Verifica ottica temperatura

La verifica ottica della temperatura (Optical Temperature Verification, OTV) è un metodo che verifica la temperatura interna alla provetta nel Rotor-Gene Q MDx. La convalida della temperatura in provetta può essere una procedura importante nei laboratori certificati. L'OTV viene eseguita con un kit Rotor-Disc OTV (vedere Appendice C). Di seguito riportiamo solo una breve introduzione al principio dell'OTV. Le prestazioni della procedura OTV sono spiegate nel software Rotor-Gene Q MDx. Per una descrizione più dettagliata della procedura OTV, inclusa la guida per la risoluzione dei problemi, consultare il *Manuale Rotor-Disc OTV*.

10.1 Principio OTV

La procedura OTV sfrutta le proprietà ottiche di 3 cristalli liquidi termocromatici (TLC)* come riferimenti assoluti della temperatura. Quando i cristalli TLC vengono riscaldati, da opachi diventano trasparenti a temperature molto precise (50°C, 75°C e 90°C). I TLC in sé non sviluppano fluorescenza. Pertanto è necessario coprire la fonte d'eccitazione con un inserto fluorescente in modo che i punti di transizione dei TLC possano essere rilevati dal sistema ottico del Rotor-Gene Q MDx. I TLC che sono al di sotto della loro temperatura di transizione sono opachi e riflettono la luce. Una parte della luce riflessa si disperde verso il rilevatore, aumentando la fluorescenza. Quando la temperatura in provetta raggiunge il punto di transizione del TLC, questo diventa trasparente e la luce passa attraverso il campione invece di essere riflessa verso il rilevatore, con conseguente diminuzione della fluorescenza. La variazione della fluorescenza serve a determinare la temperatura di transizione esatta di ogni TLC. La temperatura di transizione viene confrontata con quella riportata nel file di calibrazione

* Quando si lavora con solventi o sostanze tossiche volatili, si deve prevedere un sistema efficiente di ventilazione del laboratorio per eliminare i vapori eventualmente prodotti. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede tecniche di sicurezza (SDS), disponibili presso il fornitore del prodotto.

di fabbrica dell'OTV Rotor-Disc per verificare se il Rotor-Gene Q MDx rientra nelle specifiche di temperatura.

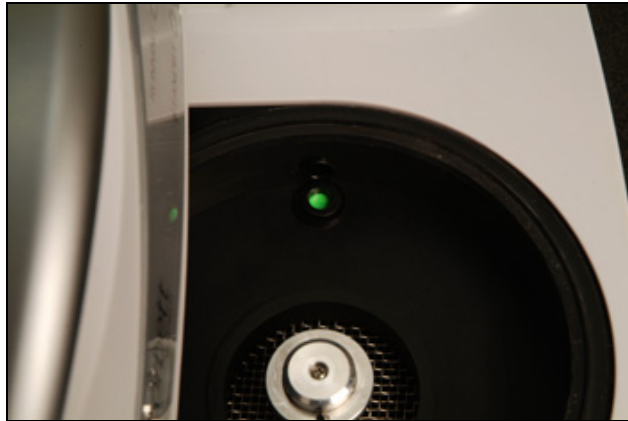
10.2 Componenti del kit Rotor-Disc OTV

Per eseguire una OTV occorrono i seguenti componenti:

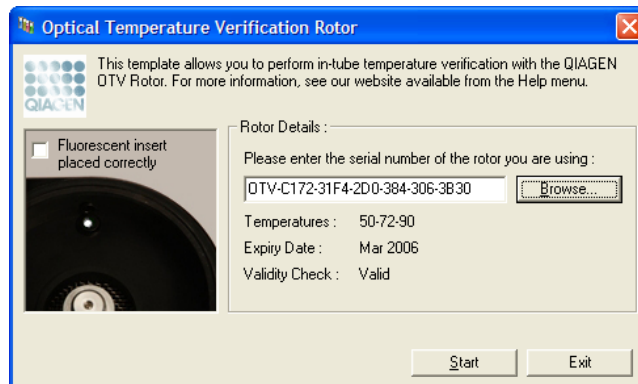
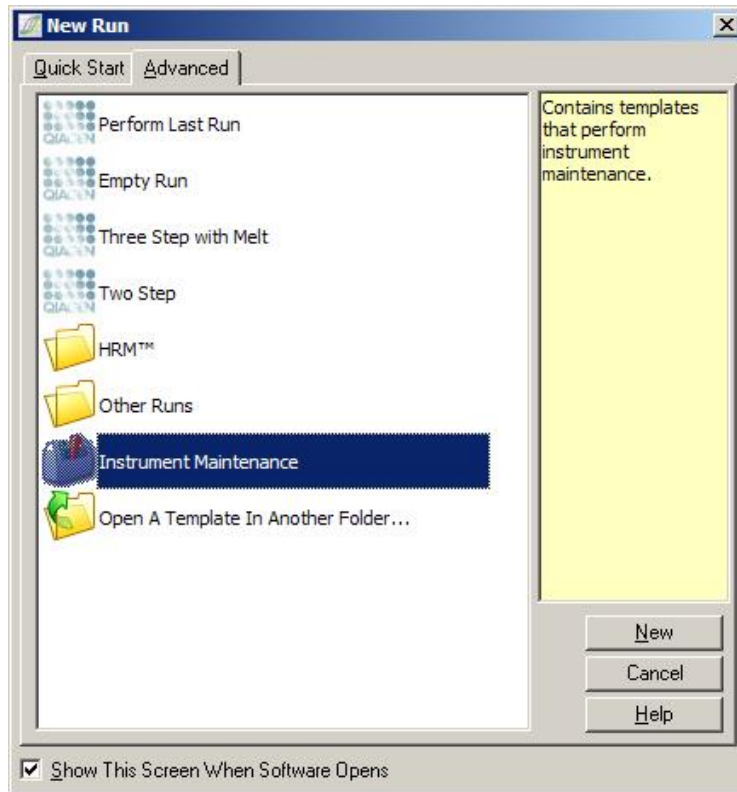
- Un kit Rotor-Disc OTV, comprendente:
 - Rotore sigillato Rotor-Disc 72 OTV (contiene i TLC)
 - Inserto fluorescente per scatter plate (Rotor-Gene 3000 o Rotor-Gene Q/6000)
 - Un CD contenente i seguenti file: File con numero di matricola e data di scadenza di OTV Rotor (*.txt); file modello per test OTV (*.ret); scheda prodotto (*.pdf); file di calibrazione di fabbrica (*.rex)
 - Scheda delle specifiche
- Software serie Rotor-Gene Versione 1.7 o superiore, contenente la procedura guidata per OTV Rotor
- Rotore per Rotor-Disc 72
- Anello di bloccaggio per Rotor-Disc 72

10.3 Esecuzione di un OTV

1. Collocare l'inserto fluorescente sopra la lente di emissione sul fondo della camera del Rotor-Gene Q MDx.
2. Collocare l'OTV Rotor-Disc in un rotore Rotor-Disc 72. Fissare con un anello di bloccaggio per Rotor-Disc 72. Collocare il gruppo nel Rotor-Gene Q MDx facendo attenzione allo scatto che indica l'inserimento. Chiudere il coperchio del Rotor-Gene Q MDx.

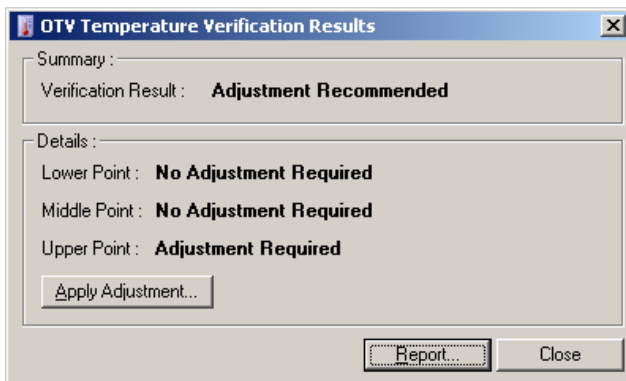


3. Accedere alla procedura guidata "Advanced" selezionando la scheda "Advanced" nella finestra "New Run". Nella procedura "Advanced", cliccare su "Instrument maintenance" e poi su "OTV". La guida chiede di inserire il numero di matricola OTV. Questo numero è visibile sull'etichetta dell'OTV Rotor-Disc o può essere importato dal CD cliccando su "Browse" (Sfogliare) e selezionando il file **.otv** fornito sul CD. Dopo aver immesso il numero, cliccare su "Start".



4. Il software richiede a questo punto un nome di file per il processo. Il processo ha poi inizio.

5. Il processo esegue una serie di fusioni che determinano le caratteristiche termiche del Rotor-Gene Q MDx.

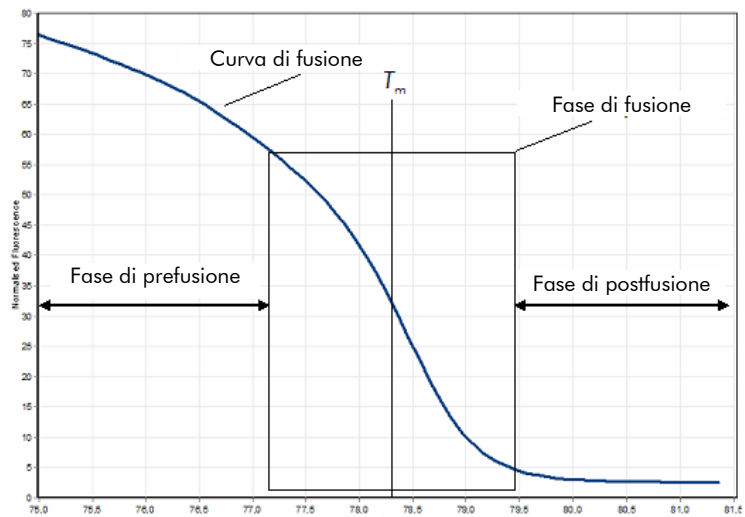


6. Quando il processo è terminato, il software indica se il Rotor-Gene Q MDx rientra nella specifica.
7. Se occorre un aggiustamento, l'utente dovrà cliccare su "Apply Adjustment" (Applica aggiustamento). Questo invita l'utente ad eseguire un processo di verifica. Completata la verifica, non dovrebbero essere richiesti altri aggiustamenti. In caso diverso, contattare il distributore locale.
8. Quando il Rotor-Gene Q MDx rientra nella specifica, si può visionare e stampare un report del processo.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

11 Analisi di fusione ad alta risoluzione

L'analisi di fusione ad alta risoluzione (HRM) è una tecnica innovativa basata sull'analisi della fusione del DNA. La HRM caratterizza i campioni di DNA secondo il loro comportamento dissociativo durante la loro transizione da DNA a doppio filamento (dsDNA) a DNA a singolo filamento (ssDNA) a temperatura crescente (vedere figura sottostante). Uno strumento HRM raccoglie i segnali fluorescenti con precisione ottica e termica estremamente alta, creando molte possibilità di applicazione.



Tipico grafico HRM. La curva di fusione traccia la transizione dall'alta fluorescenza della fase iniziale di prefusione, passando per la diminuzione di fluorescenza della fase di fusione, fino al livello basale della fluorescenza nella fase di postfusione. La fluorescenza diminuisce man mano che il colorante intercalante del DNA viene rilasciato dal dsDNA mentre si fonde in filamenti singoli. Il punto centrale della fase di fusione, in cui la velocità di cambiamento della fluorescenza è massima, definisce la temperatura di fusione (T_m) del DNA in analisi.

Prima di eseguire l'analisi HRM, la sequenza target deve essere amplificata con un numero elevato di copie. Questo è di solito eseguito dalla PCR alla presenza di un colorante fluorescente intercalante del dsDNA. Il colorante non

interagisce con lo ssDNA, mentre si intercala attivamente con il dsDNA e presenta una fluorescenza brillante quando intercalato. Si possono utilizzare i cambiamenti nella fluorescenza per misurare l'aumento di concentrazione del DNA durante la PCR e poi per misurare direttamente la fusione del DNA indotta termicamente da HRM. Durante l'analisi HRM, la fluorescenza inizialmente è elevata perché il campione inizia come dsDNA. La fluorescenza diminuisce con l'aumentare della temperatura e il DNA si dissocia in singoli filamenti. Il comportamento di fusione osservato è caratteristico di un particolare campione di DNA.

Con l'analisi HRM, il Rotor-Gene Q MDx caratterizza i campioni sulla base della lunghezza della sequenza, del tenore di GC e della complementarità della sequenza del DNA. L'analisi HRM può essere utilizzata nelle applicazioni per genotipizzazione, quali l'analisi delle inserzioni/delezioni o dei polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) o per lo screening di mutazioni genetiche sconosciute. Può essere utilizzata anche in applicazioni di epigenetica per rilevamento e analisi dello stato di metilazione del DNA. Inoltre può essere utilizzata per il rilevamento quantitativo di una piccola porzione di DNA variante in un background di sequenza di wild-type a un approccio sensibile al 5%. Questo può servire, per esempio, per studiare le mutazioni acquisite somaticamente o i cambiamenti nello stato di metilazione delle isole CpG.

L'analisi HRM sul Rotor-Gene Q MDx facilita le applicazioni multiple, fra cui:

- Identificazione di geni candidati predisponenti
- Studi di associazione (confronto di casi e controlli, da genotipo a fenotipo)
- Determinazione della prevalenza degli alleli entro una popolazione o un sottogruppo
- Screening per SNP e convalida
- Screening per perdita di eterozigotità
- Impronta del DNA
- Caratterizzazione dei blocchi aploipici
- Analisi della metilazione del DNA
- Mappatura del DNA

- Identificazione della specie
- Scoperta di mutazioni
- Determinazione del rapporto delle mutazioni somatiche acquisite
- Tipizzazione HLA

L'HRM è più facile e meno costosa dei dosaggi per genotipizzazione basati su sonda e, diversamente dai metodi convenzionali, è un sistema a provetta chiusa che impedisce la contaminazione con prodotti PCR. I risultati sono paragonabili ai metodi convenzionali, quali SSCP, DHPLC, RFLP e sequenziamento del DNA.

11.1 Strumentazione

Il Rotor-Gene Q MDx dispone delle seguenti impegnative capacità in tempo reale e termo-ottiche richieste per la HRM.

- Illuminazione ad alta intensità
- Rilevamento ottico ad alta sensibilità
- Acquisizione rapida dei dati
- Controllo raffinato della temperatura del campione
- Minima variabilità termica e ottica tra campione e campione

11.2 Sostanze chimiche

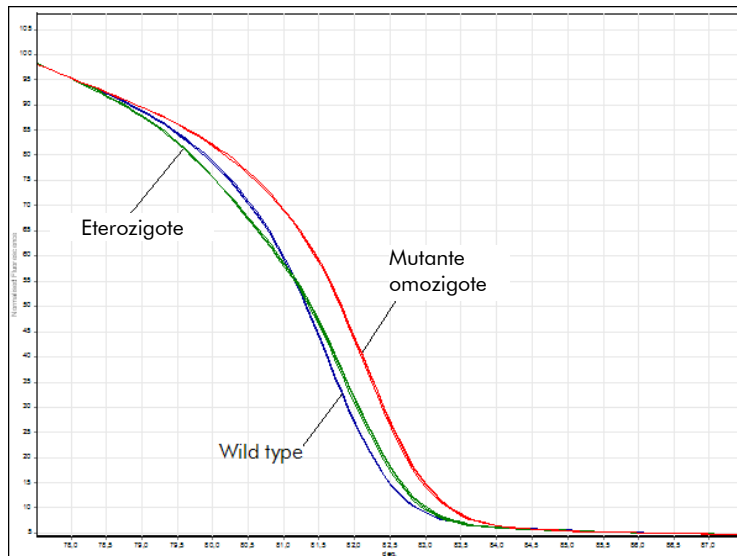
QIAGEN offre il kit Type-it® HRM PCR per l'analisi degli SNP e delle mutazioni mediante HRM e il kit EpiTect® HRM PCR Kit per l'analisi della metilazione. Entrambi i kit contengono il colorante EvaGreen di terza generazione, intercalante e fluorescente. Questi kit combinano un tampone HRM ottimizzato e una DNA polimerasi HotStarTaq® Plus per evitare l'amplificazione aspecifica dei prodotti e dare risultati affidabili.

Nota: Tutti i kit e reagenti QIAGEN HRM sono idonei all'uso con gli strumenti Rotor-Gene Q solo per le applicazioni descritte nei manuali dei rispettivi kit QIAGEN.

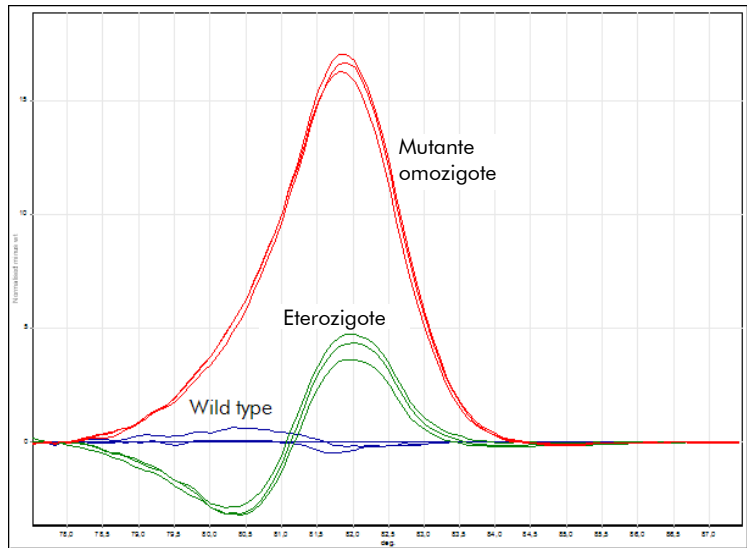
11.3 Esempio di genotipizzazione di SNP

Nell'esempio riportato, il kit Type-it HRM PCR è stato utilizzato nell'analisi HRM per distinguere tra wild-type omozigote, mutante omozigote e forme eterozigotiche dell'SNP umano rs60031276. Per i dettagli tecnici, consultare il *Manuale Type-it HRM PCR*.

A



B



C

HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	■	AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	■	unknown	homo AA	99,49
24	■	unknown	homo AA	99,76
28	■	AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	■	unknown	hetero AG	99,49
30	■	unknown	hetero AG	98,47
34	■	GG Human SNP rs60031276	homo GG	100,00
35	■	unknown	homo GG	98,80
36	■	unknown	homo GG	99,53

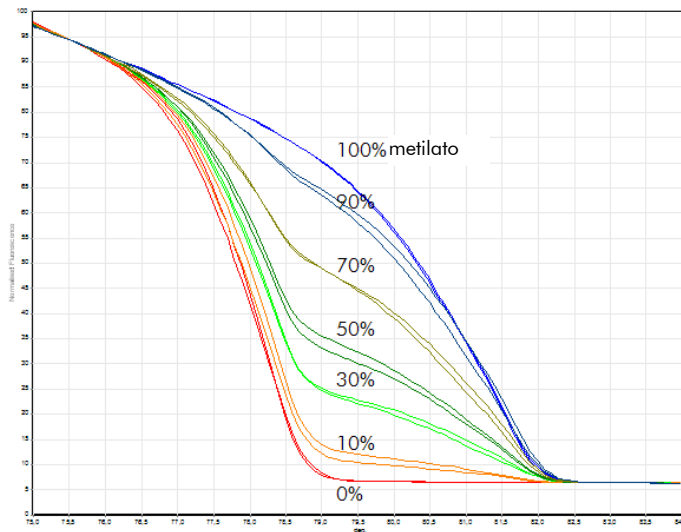
Genotipizzazione di SNP mediante HRM. L'SNP umano rs60031276 (sostituzione di A a G) nel gene PPP1R14B (fosfatasi proteica 1, subunità regolatrice (inibitrice) 14B) è stato analizzato sul Rotor-Gene Q utilizzando 10 ng di DNA genomico di genotipi differenti e il kit Type-it HRM. I campioni wild-type omozigote (AA), mutante omozigote (GG) ed eterozigote (AG) sono mostrati su **A**, una curva di fusione standard normalizzata, e su **B**, un grafico differenziale

normalizzato per campioni wild-type. I genotipi **C** per i campioni sconosciuti sono stati assegnati dal software Rotor-Gene Q.

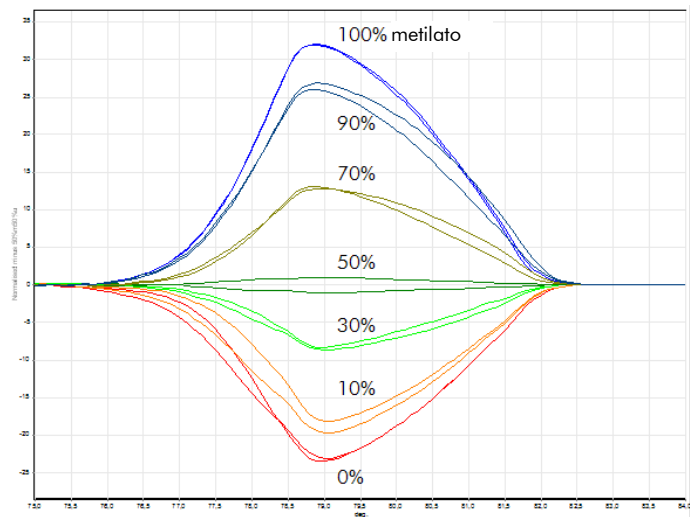
11.4 Esempio di analisi della metilazione

Nell'esempio riportato, si è utilizzato il kit EpiTect HRM PCR nell'analisi HRM per distinguere tra i vari rapporti del DNA metilato e non metilato. Per i dettagli tecnici, consultare il *Manuale EpiTect HRM PCR*.

A



B



Analisi di metilazione quantitativa mediante HRM. Vari rapporti di DNA-APC metilati e non metilati (adenomatosis polyposis coli) sono stati analizzati e discriminati mediante analisi o HRM della metilazione sul Rotor-Gene Q con il kit EpiTect HRM. Sono mostrate **A**, una curva di fusione standard normalizzata, e **B**, un grafico differenziale normalizzato al campione metilato al 50%.

11.5 Linee guida per la riuscita dell'analisi HRM

La riuscita dell'analisi HRM dipende in larga misura dalla sequenza particolare ricercata. Possono compromettere l'esito certi motivi della sequenza, quali ripiegamenti a forcina (hairpin loop) o altre strutture secondarie, regioni localizzate con tenore di GC insolitamente elevato o basso o sequenze di ripetizione. Inoltre, l'uso di kit standardizzati e di protocolli ottimizzati di QIAGEN possono ovviare a molti dei potenziali inconvenienti elencati. Forniamo di seguito alcune semplici linee guida che possono contribuire ad assicurare la buona riuscita.

Analizzare piccoli frammenti di DNA

Analizzare frammenti non superiori a 250 bp. Anche prodotti più grandi possono essere analizzati con successo, ma di solito danno una risoluzione inferiore. Questo perché, per esempio, una singola variazione di base ha sul comportamento in fusione di un amplicone da 100 bp un effetto maggiore che su un amplicone da 500 bp.

Accertarsi che la PCR contenga un solo prodotto specifico

I campioni contaminati da artefatti post PCR, quali i dimeri di primer o prodotti aspecifici, possono rendere difficile l'interpretazione dei risultati HMR. I kit QIAGEN per l'analisi HRM garantiscono la massima specificità senza bisogno di ottimizzazione.

Usare uno stampo con preamplificazione sufficiente

L'analisi dei dati PCR in tempo reale può essere molto utile nella ricerca degli errori nelle analisi HRM. I grafici di amplificazione dovrebbero avere un C_T (ciclo soglia) pari o inferiori a 30 cicli. I prodotti che si amplificano successivamente a questo (a causa della bassa quantità di stampo di partenza o del degrado dello stampo) producono risultati variabili HRM a causa di artefatti nel PCR.

Normalizzare la concentrazione dello stampo

La quantità di stampo aggiunta alla reazione dovrebbe essere consistente. Normalizzare le concentrazioni di partenza in modo che tutti i grafici di amplificazione distino di 3 valori C_T al massimo tra loro. Si garantisce così che le concentrazioni immesse rientrino in un range di 10 volte.

Controllare le amplificazioni aberranti dei grafici

Prima di eseguire un'analisi HRM, esaminare attentamente se i dati dei grafici di amplificazione presentino forme anomale. I grafici con una fase log-lineare che non è ripida, che è seghettata o che raggiunge un basso plateau di segnale rispetto ad altre reazioni, possono indicare un'amplificazione

inadeguata o un segnale di fluorescenza troppo basso (per es. questo potrebbe verificarsi se la concentrazione del primer era troppo bassa). Le reazioni inadeguate possono essere causate da inibitori o da preparazione non corretta della reazione. I dati HRM di questi campioni possono essere non conclusivi o a bassa risoluzione. Per evitare risultati inaffidabili, raccomandiamo i kit QIAGEN per la preparazione del campione e per l'analisi HRM.

Mantenere simili le concentrazioni del campione postamplificazione

La concentrazione di un frammento di DNA influisce sulla sua temperatura di fusione (T_m). Per questo motivo le concentrazioni del DNA devono essere mantenute il più possibile simili. Quando si analizzano dei prodotti PCR, verificare che ogni reazione si sia amplificata fino alla fase di plateau. Al plateau, tutte le reazioni si saranno amplificate in modo simile indipendentemente dalla quantità iniziale. Si noti tuttavia che le reazioni inadeguate potrebbero non raggiungere il plateau con la stessa quantità amplificata, a causa per es. di una preparazione del dosaggio di scarsa consistenza (per es. con una concentrazione troppo bassa del primer).

Verificare l'uniformità da campione a campione

Tutti i campioni devono essere di pari volume e dovrebbero contenere la stessa concentrazione di colorante. Il comportamento di fusione del DNA è influenzato dai sali nella miscela di reazione, quindi è importante che in tutti i campioni sia il più possibile uniforme la concentrazione di tampone, Mg e altri sali. Analogamente, utilizzare solo provette di reazione identiche della stessa marca per evitare variazioni dovute allo spessore della plastica e alle caratteristiche di autofluorescenza.

Consentire una raccolta sufficiente di dati per le fasi di prefusione e postfusione

Catturare i punti dati HRM su un range approssimativo di 10°C, con centro intorno al T_m osservato (vedere figura a

pag. 11-1). Si forniscono così punti dati di baseline sufficienti per la normalizzazione della curva effettiva, con il risultato di replicati più riproducibili e interpretazione più agevole dei risultati.

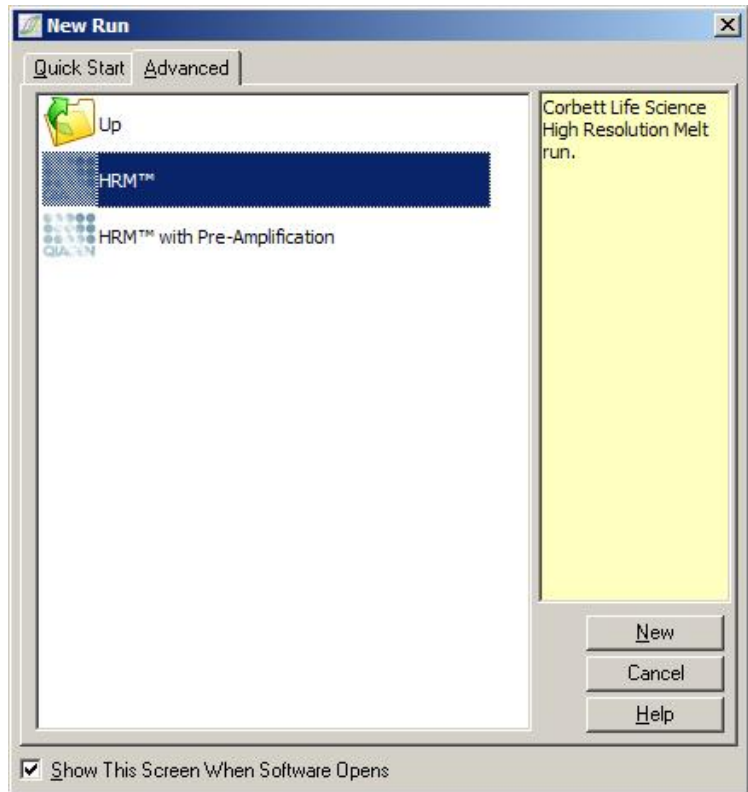
11.6 Preparazione del campione

Evitare il degrado del campione durante la purificazione e la conservazione. Evitare quantità eccessive di inibitori, quali quelle causate da un carryover di etanolo. Per migliorare i risultati HRM, raccomandiamo di mantenere costante tra i campioni la quantità di stampo usata. Si raccomanda l'analisi spettrofotometrica per determinare la concentrazione e la purezza del DNA. Raccomandiamo i kit QIAGEN per la preparazione del campione.

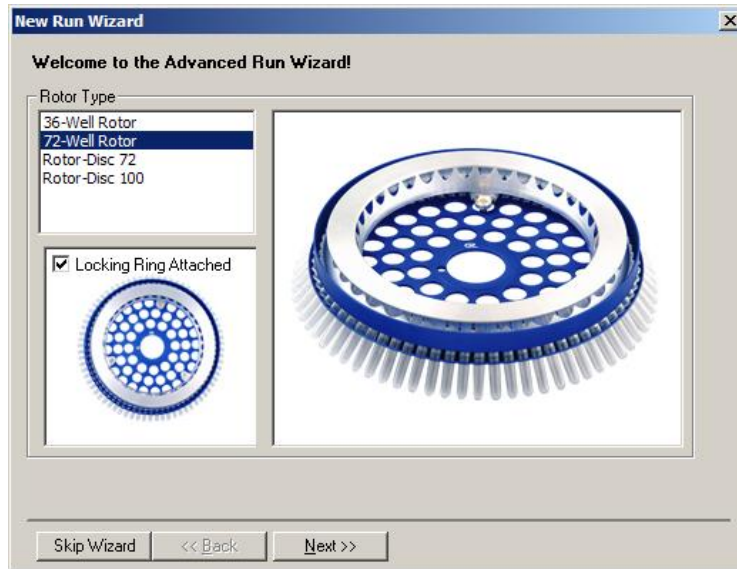
Nota: A 260 nm un'unità di assorbanza è pari a 50 $\mu\text{g/ml}$ di DNA. Il DNA puro dà un rapporto tra 260 nm e 280 nm di 1,8.

11.7 Preparazione del software

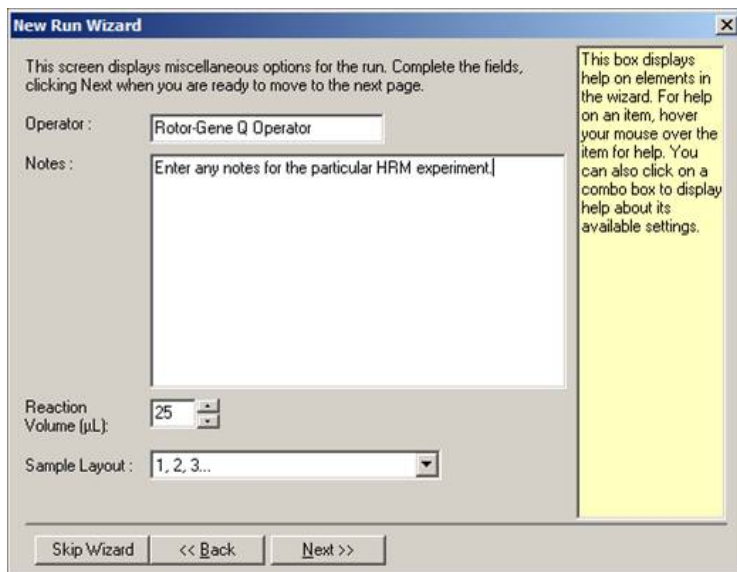
1. Aprire un nuovo file di processo selezionando "New..." dal menu "File". Selezionare "HRM" nella guida "Advanced".



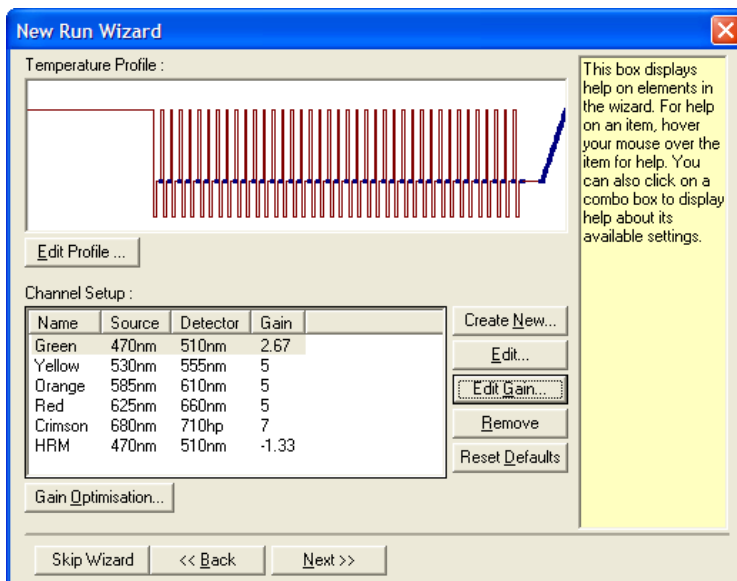
2. Impostare il tipo di rotore (in questo esempio è stato utilizzato il rotore a 72 pozzetti). Verificare che l'anello di bloccaggio sia al suo posto e che la casella "Locking Ring Attached" sia stata selezionata prima di passare alla fase successiva.



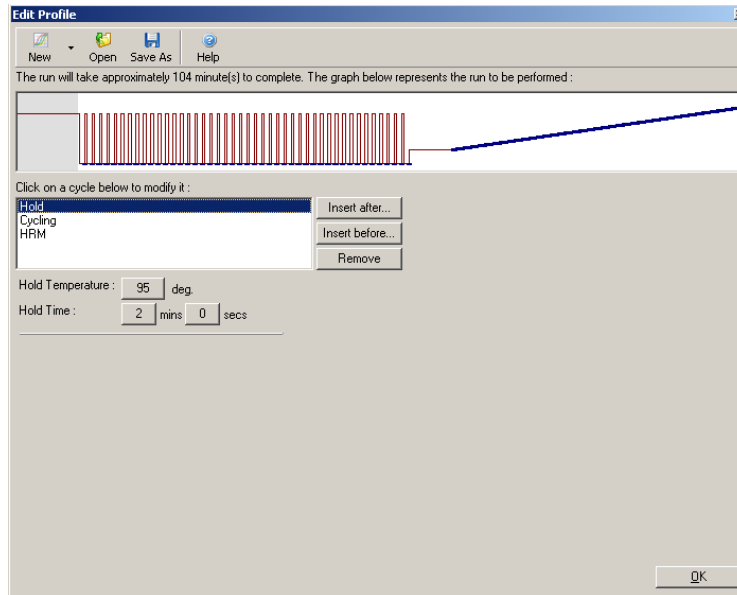
3. Impostare i dettagli del processo. Immettere il nome dell'operatore (opzionale) e aggiungere eventuali note sull'esperimento (opzionale). Selezionare il volume di reazione (obbligatorio) e il layout desiderato del campione.



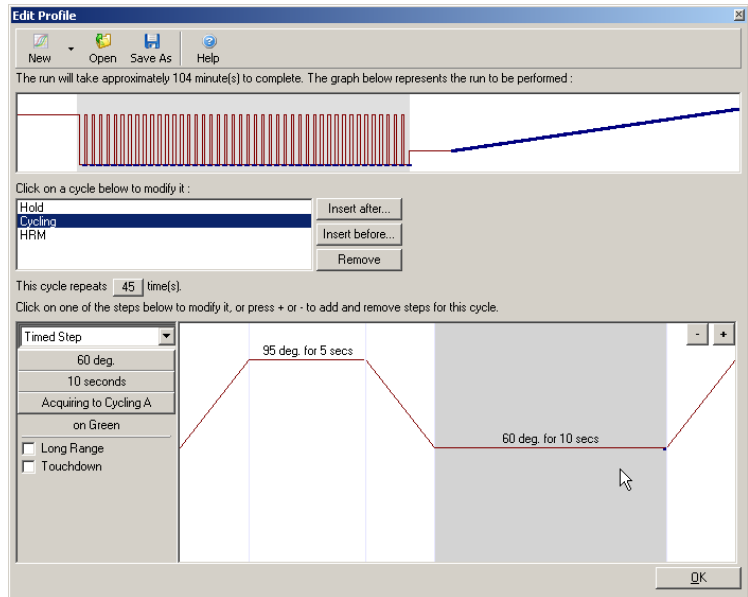
4. Cliccare sul pulsante “Edit Profile...” per modificare tempi e temperature della reazione.



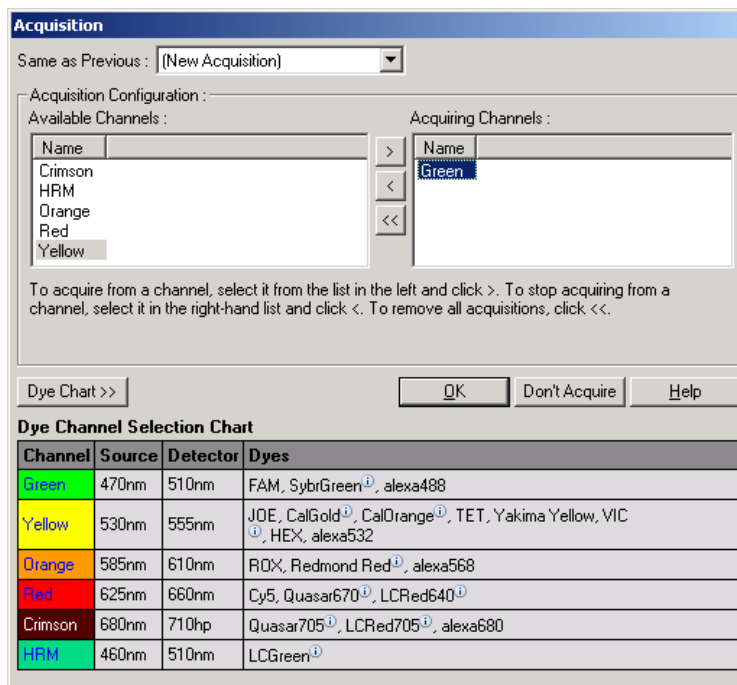
5. Impostare un adeguato tempo di sosta iniziale. Questo tempo dipende dal tipo di DNA polimerasi utilizzato. Il kit Type-it HRM PCR e il kit EpiTect HRM PCR richiedono un tempo d'attivazione di 5 minuti. Il tempo di attivazione di default è di 10 minuti.



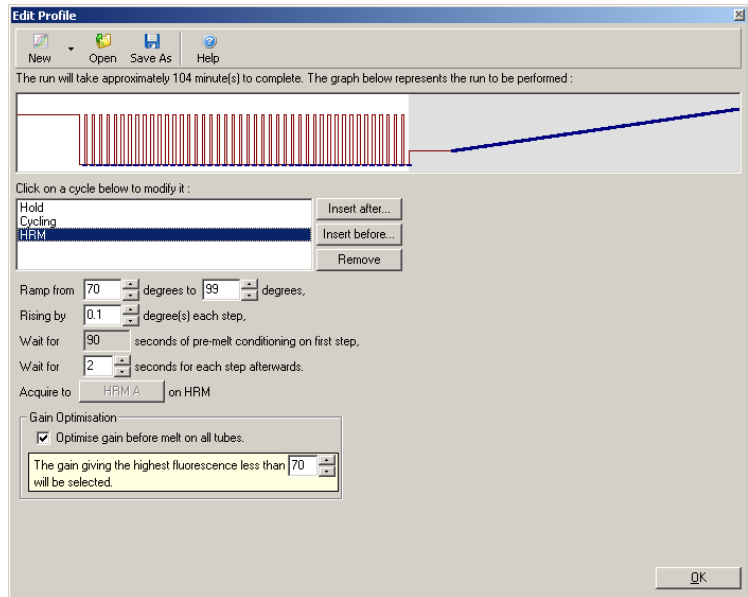
6. Modificare il ciclo per adattarlo all'amplicone.



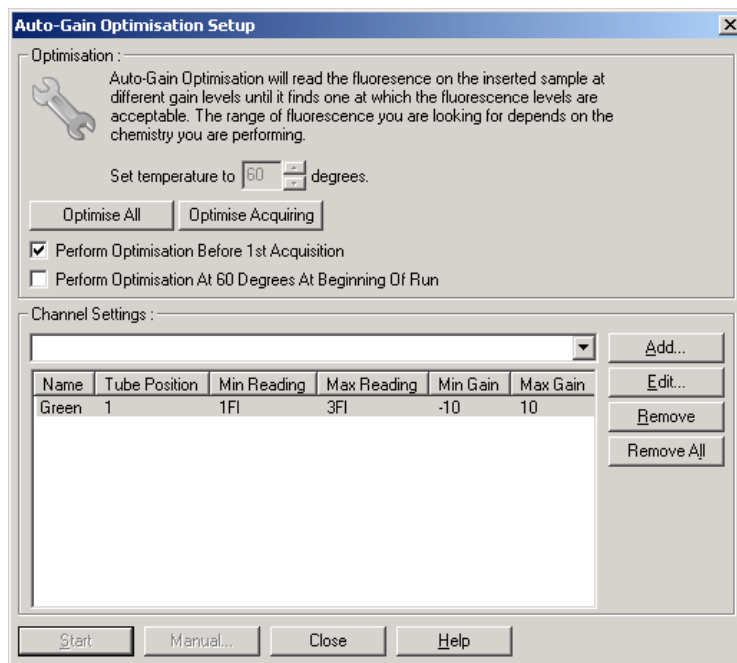
7. Verificare che vengano acquisiti i dati della fluorescenza. Acquisire dati per il canale verde alla fine della fase di annealing.



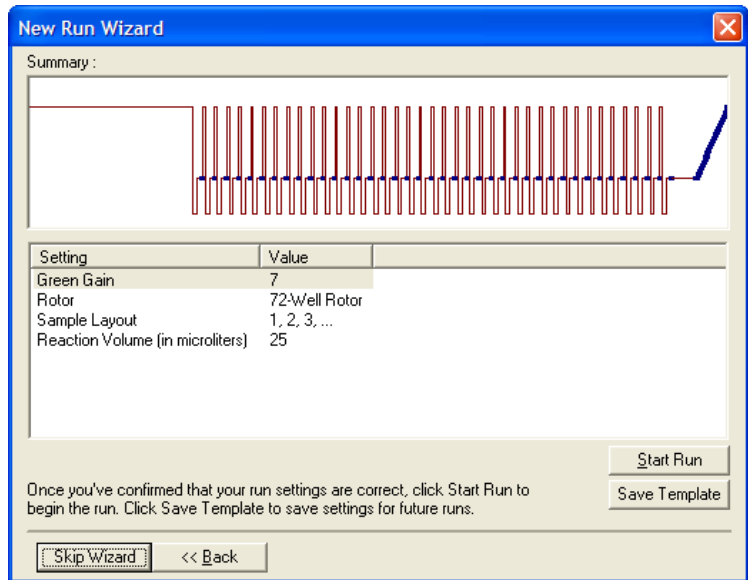
- Impostare le condizioni del processo HRM. Modificare le condizioni per adattarle all'amplicone. Per la prima serie di esperimenti, consentire un dominio di fusione ampio. Utilizzare la T_m teorica come guida per un range idoneo. Una volta stabilito dove il prodotto si fonderà, ridurre il dominio di fusione a non oltre i 10°C. Verificare che la fusione abbia inizio 5°C prima della prima transizione di fusione. La rampa di default è fissata a 0,1°C con una sosta di 2 secondi ad ogni fase. La rampa minima di transizione è di 0,05°C con una seconda sosta ad ogni fase. I dati sono acquisiti automaticamente al canale HRM. L'Automatic "Gain Optimisation" (Ottimizzazione automatica del gain) viene eseguita per default. Il software ricerca l'impostazione ottimale del gain in modo che il massimo valore della fluorescenza riportato non sia superiore a 70 unità su una scala di 100. Si noti che può essere aumentato fino a un massimo di 100.



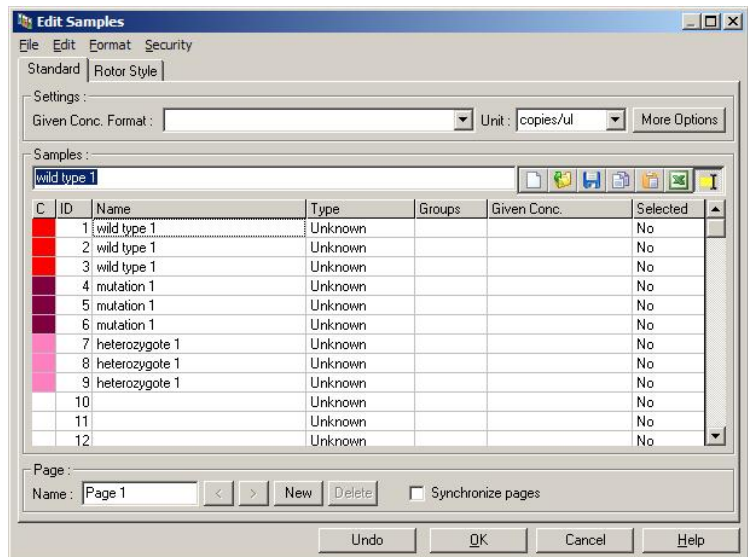
9. Opzionale: impostare "Auto-Gain Optimisation". Questo è applicabile alla sola fase di amplificazione in tempo reale e l'impostazione è per il canale verde. Cliccare sul pulsante "Optimize Acquiring" (per ottimizzare solo i canali utilizzati in un processo). Il momento migliore per l'ottimizzazione è subito prima della prima fase di acquisizione, quindi selezionare la casella "Perform Optimization Before First Acquisition" (Eseguire ottimizzazione prima della prima acquisizione). Il range consigliato per la fluorescenza di background per i coloranti intercalanti è fra 1 e 3 unità di fluorescenza. Per cambiare questa impostazione, cliccare sul nome del canale per selezionarlo nell'elenco e poi sul pulsante "Edit".



10. Avviare il processo cliccando su "Start Run" e salvare sul proprio computer il file del processo.



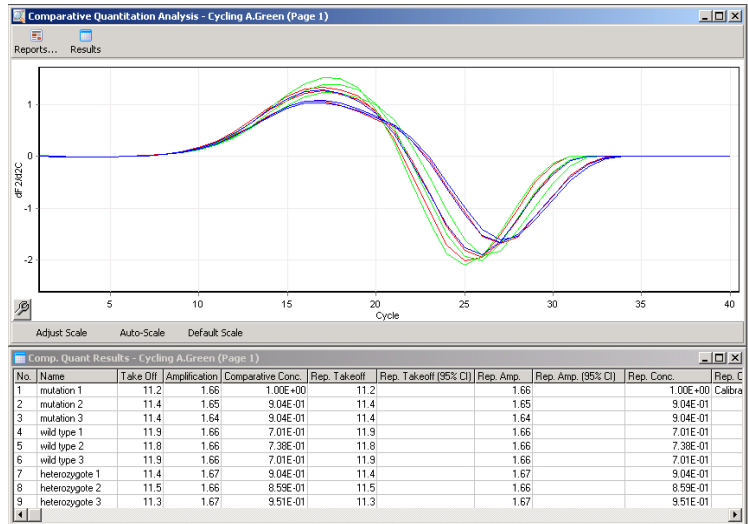
11. Cambiare i nomi dei campioni (opzionale). Il nome dei campioni può essere cambiato durante o dopo un processo.



11.8 **Analisi dati PCR in tempo reale**

L'analisi dei dati PCR in tempo reale prima dell'analisi dei dati HRM è vantaggiosa. I dati PCR in tempo reale possono evidenziare dei dosaggi di dubbia riuscita. Identificando questi valori estremi e filtrandoli per escluderli dall'analisi HRM successiva, si migliora molto l'efficienza generale dell'analisi HRM, perchè analizzando un prodotto PCR di cattiva qualità si avranno risultati HRM di cattiva qualità. Raccomandiamo di analizzare come segue i dati PCR quantitativi in tempo reale.

1. Analizzare i dati in tempo reale mediante l'opzione "Quantitation" nella finestra "Analysis". Se uno dei valori C_T è pari o superiore a 30, le reazioni corrispondenti sono considerate come amplificate troppo tardi. Questi campioni devono essere analizzati con molta cautela o rimossi dall'analisi come valori estremi. L'amplificazione tardiva di solito è dovuta ad un quantitativo troppo piccolo dello stampo iniziale e/o a livelli elevati di degrado del campione.
2. Valutare il livello della fluorescenza nel punto finale. Se la fluorescenza nel punto finale in uno dei grafici di amplificazione è bassa rispetto alla maggioranza dei grafici nella serie di dati, omettere tali campioni dall'analisi anche se il loro valore C_T è inferiore a 30. La bassa fluorescenza nel punto finale può indicare una quantità non corretta di colorante, livelli non corretti di componenti di reazione (ad es. primer) o l'azione di inibitori.
3. Utilizzare l'opzione "Comparative Quantitation" della finestra "Analysis" per ottenere l'efficienza di reazione di ogni campione. Se l'efficienza non è simile ad altre reazioni dell'esperimento o è inferiore all'1,4 circa, omettere la reazione come valore estremo.



Risultati della quantificazione comparativa. L'efficienza della reazione è mostrata dalla colonna "Amplification" come un punteggio su 2 (2 = 100% efficienza).

Nota: Se si sospetta la presenza di dimeri di primer o di prodotti aspecifici, valutare le reazioni tracciando un grafico derivativo mediante l'opzione "Melt" nella finestra "Analysis". Verificare che sia presente un solo picco, indicatore di un singolo prodotto. Se possibile, eseguire un'elettroforesi in gel per controllare che sia presente un unico prodotto di amplificazione. Se è presente più di un prodotto, la reazione dovrebbe essere ripetuta o riottimizzata.

11.9 Analisi dei dati HRM

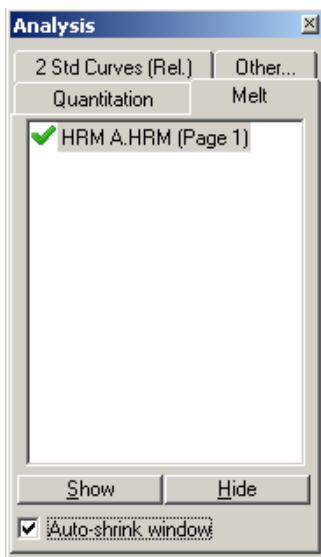
L'analisi HRM permette l'appaiamento visivo e automatico dei genotipi. I risultati possono essere visualizzati come grafico di fusione normalizzato o come grafico differenziale. Le curve normalizzate forniscono la rappresentazione base dei diversi genotipi basati sullo spostamento della curva (per gli omozigoti) e sul cambio di forma della curva (per gli eterozigoti).

I grafici differenziali sono un ausilio per l'interpretazione visiva, in quanto tracciano la differenza nella fluorescenza di un campione rispetto a un controllo selezionato ad ogni transizione termica. I grafici differenziali forniscono una visualizzazione alternativa della differenza fra le transizioni nella curva di fusione.

Nota: L'analisi della prima derivata della curva di fusione (usata dall'opzione standard "Melt" della finestra "Analysis") è considerata inadeguata per l'analisi HRM. Questo perché ogni derivazione dei dati aggiunge rumore artificiale e rende più difficile l'interpretazione dei dati.

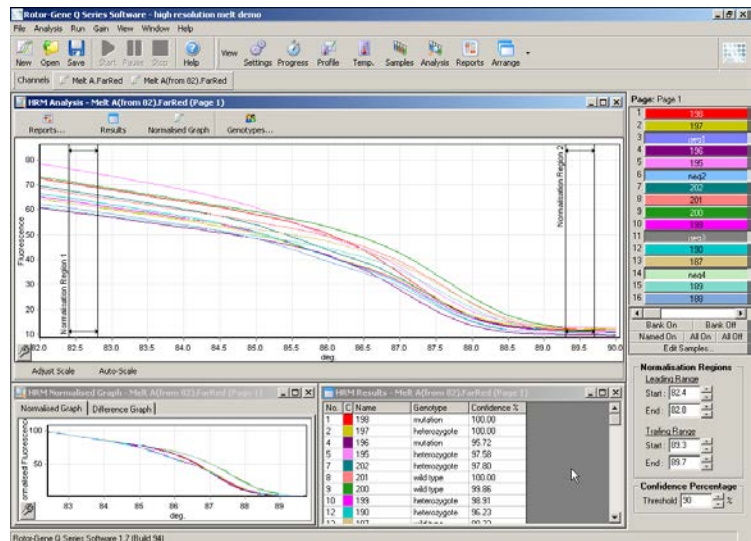
Le seguenti fasi descrivono l'analisi dei risultati dell'HRM mediante il software Rotor-Gene Q.

1. Selezionare l'opzione "HRM" dalla finestra "Analysis".



2. Si aprono delle finestre contenenti i dati grezzi, il grafico normalizzato e i risultati. La finestra dei dati grezzi permette aggiustamenti delle regioni di normalizzazione. La normalizzazione permette di confrontare tutte le curve con lo stesso livello di segnale fluorescente iniziale e finale per favorire l'interpretazione e l'analisi. Sono forniti

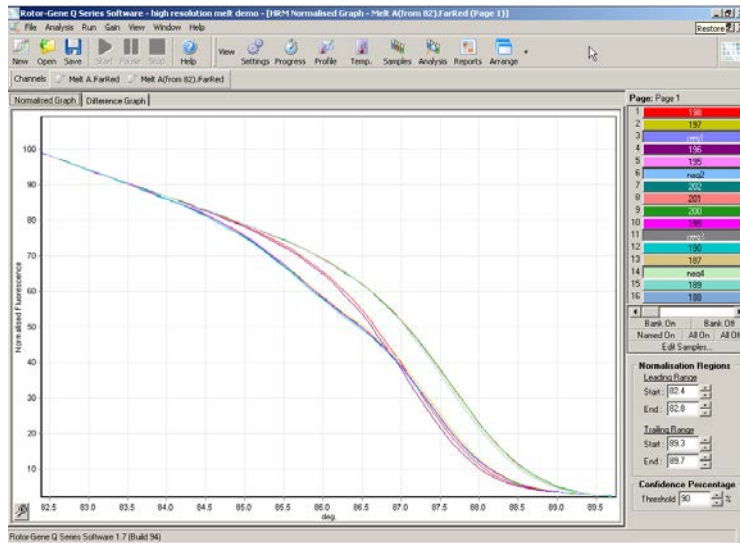
due cursori per ogni regione, alle estremità della curva per default. I punti dati all'interno delle regioni servono per normalizzare la fluorescenza (solo asse y) per l'inizio (Regione 1) e la fine (Regione 2) del grafico di fusione. I dati esterni alle regioni stabilite sono ignorati. Aggiustare le regioni per comprendere i dati di baseline rappresentativi per le fasi di pre e post-fusione. Allargando le regioni (cliccare e trascinare) si permette al software di aggiustarsi sulla pendenza della linea base. Per verificare che le curve si normalizzano efficientemente, evitare di ampliare le regioni di normalizzazione fino alla fase di fusione.



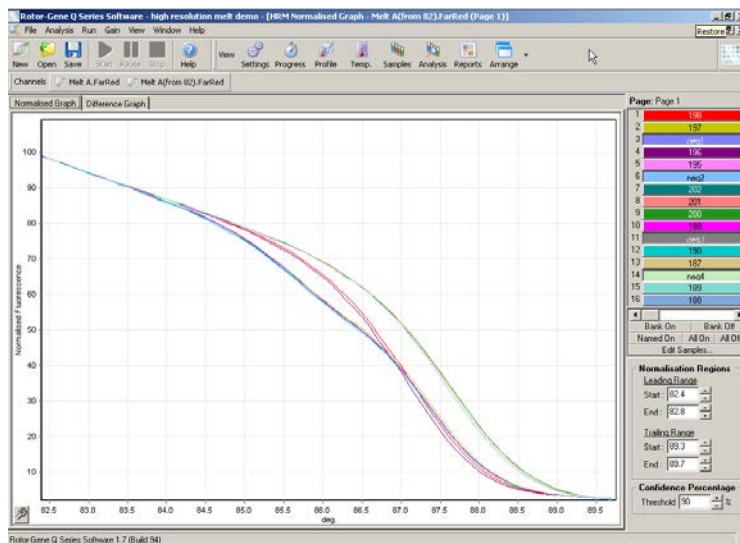
Nota: Raccomandiamo di spostare i cursori solo se si desidera evitare le aree della curva di fusione. Il movimento dei cursori verso le transizioni della fase di fusione possono influire sui grafici di sottrazione e sulle percentuali di confidenza.

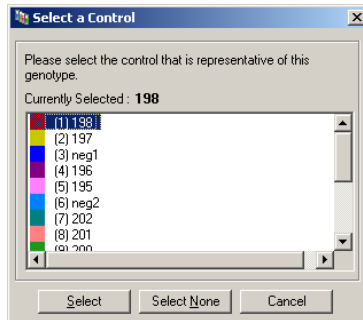
3. La finestra "Normalised Graph" (Grafico normalizzato) visualizza le curve di fusione normalizzate. I campioni possono essere visualizzati anche come grafico differenziale rispetto a uno dei controlli.

Analisi di fusione ad alta risoluzione

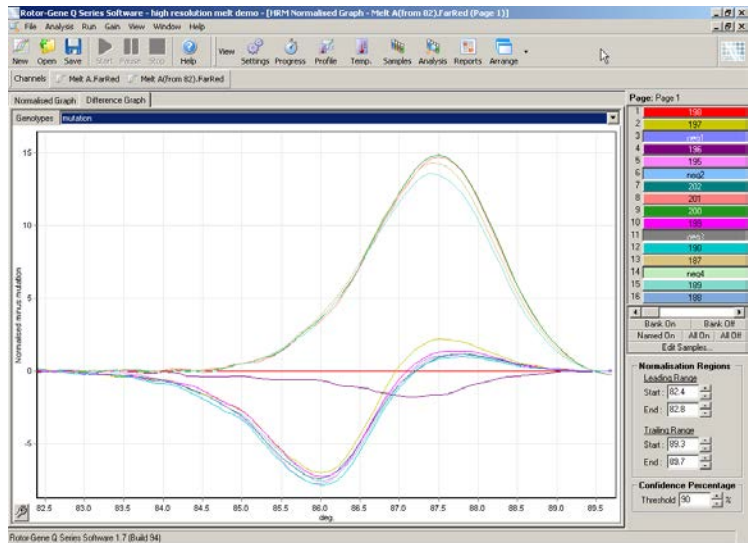


4. Cliccare sul pulsante "Genotypes..." per definire i genotipi. Immettere ciascun nome della categoria di genotipo e selezionare un campione rappresentativo dall'elenco dei campioni.



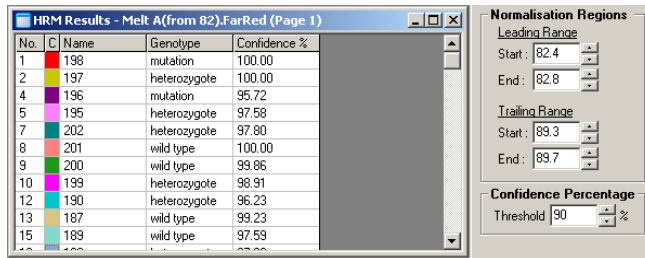


- Visualizzare il grafico differenziale selezionando la scheda "Difference Graph" (Grafico differenziale). Poi selezionare il genotipo che si vuole confrontare con tutti gli altri campioni mediante il menu a tendina in alto nella finestra. Nell'esempio mostrato, tutti i campioni sono tracciati sottraendoli da un grafico della media di tutti i campioni etichettati "Mutation 1" (Mutazione 1).



- I genotipi saranno nominati automaticamente dal software nella finestra "Results" (Risultati). Viene fornito un valore di confidenza come controllo d'integrità dei risultati nominati automaticamente. Si può modificare il valore di soglia al di sopra del quale sono eseguite le

nominazioni automatiche. I campioni che cadono al di sotto della soglia fissata saranno marcati come variazione per un'indagine più attenta o la ripetizione del test.



The screenshot shows a software window titled "HRM Results - Melt A(from 82).FarRed (Page 1)". It contains a table with columns for "No.", "C", "Name", "Genotype", and "Confidence %". To the right of the table is a "Normalisation Regions" panel with "Leading Range" and "Trailing Range" settings, and a "Confidence Percentage" panel with a "Threshold" set to 90%.

No.	C	Name	Genotype	Confidence %
1		198	mutation	100.00
2		197	heterozygote	100.00
4		196	mutation	95.72
5		195	heterozygote	97.58
7		202	heterozygote	97.80
8		201	wild type	100.00
9		200	wild type	99.86
10		199	heterozygote	98.91
12		190	heterozygote	96.23
13		187	wild type	99.23
15		189	wild type	97.59

Normalisation Regions

Leading Range
Start: 82.4
End: 82.8

Trailing Range
Start: 89.3
End: 89.7

Confidence Percentage
Threshold: 90 %

12 Risoluzione dei problemi

12.1 Log Archives

Il software mantiene una registrazione non modificata di ogni processo, insieme alle informazioni diagnostiche, nel deposito Log Archives. Usando l'opzione "Help", "Send Support Email", si può inviare una e-mail insieme con tutte le necessarie informazioni diagnostiche a QIAGEN Technical Service (vedere Sezione 7.12.1).

Per salvare spazio sul disco, sono conservati solo i Log Archives dei 60 processi più recenti. I Log Archives dei processi meno recenti saranno sovrascritti dalla creazione di nuovi archivi.

12.2 Risoluzione problemi in HRM

Commenti e suggerimenti

Impossibile eseguire HRM

Il modello di Rotor-Gene Q MDx non è predisposto per HRM	Rivolgersi al rappresentante QIAGEN di zona.
--	--

Non si è ottenuto nessun dato HRM

Setup non corretto	<p>Verificare le impostazioni dei filtri.</p> <p>Verificare che il tipo di rotore sia corretto.</p> <p>Verificare che siano stati usati i reagenti corretti.</p> <p>Verificare che la reazione sia stata impostata correttamente.</p> <p>Eseguire un esperimento con controllo positivo (cioè un dosaggio di cui si sa che darà risultati).</p>
--------------------	---

Commenti e suggerimenti

I grafici sono seghettati.

Amplificazione insufficiente o assente	Verificare che siano stati usati i protocolli e i reagenti corretti. Raccomandiamo i kit QIAGEN per l'analisi HRM. Verificare che la reazione sia stata impostata correttamente. Verificare le condizioni del ciclo. Verificare qualità e quantità iniziali dello stampo. Raccomandiamo i kit QIAGEN per la preparazione del campione.
--	---

I grafici di amplificazione o fusione sono saturi

Impostazione troppo alta del gain	Usare "Auto-Gain Optimisation" (vedere pag. 6-24).
-----------------------------------	--

Le percentuali di confidenza sono cambiate

Le regioni di normalizzazione sono state spostate mediante clic e trascinamento	Spostare le regioni di normalizzazione solo se necessario per evitare certe parti della curva di fusione.
---	---

Sono presenti valori estremi nei dati

Setup della reazione incoerente	Verificare che siano stati usati i reagenti corretti. Verificare che le provette usate siano uniformi.
Inibitori presenti nel campione	Verificare che sia stata usata la stessa miscela master per tutti i campioni.
Stampo troppo piccolo o degradato	Verificare qualità e quantità iniziali dello stampo.

12.3 Errori generali dello strumento

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
Can't open the serial port <COMPORT>	Impossibile aprire la porta seriale <COMPORT> (PORTA COM)	<p>Questo errore si verifica al lancio del software se il software non riesce a comunicare con lo strumento tramite la porta COM configurata. Questo è causato comunemente da cavi difettosi o staccati, difetti delle porte seriali, problemi del driver USB o del driver di conversione da USB a seriale.</p> <p>Ricollegare o sostituire il cavo. Reinstallare i driver opportuni. Lanciare il software in "Virtual Mode" e selezionare il pulsante "Setup/Auto-Detect" dal menu "File" per resettare la porta COM configurata.</p>
<p>Chamber lid open</p> <p>Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software.</p>	<p>Coperchio camera aperto</p> <p>Impossibile continuare il processo; il coperchio della camera è stato aperto durante un processo. Resettare la macchina e riavviare il software.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il software rileva l'apertura del coperchio nel mezzo di un processo.</p> <p>Resettare la macchina e riavviare il software.</p>

Risoluzione dei problemi

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
Chamber lid open The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue.	Coperchio camera aperto Il coperchio della camera dello strumento è aperto. Chiudere il coperchio e cliccare su "Continue" (Continua).	Questo errore si verifica quando l'utente tenta di avviare un processo con il coperchio dello strumento aperto. Chiudere il coperchio della camera dello strumento e cliccare su "Continue".
Communication corrupted	Comunicazione alterata	Questo errore si verifica quando i dati ricevuti dallo strumento non sono conformi al pattern previsto. Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema. Contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.
Communication out of sequence Instrument has received data from the machine that is out of sequence.	Comunicazione fuori sequenza Lo strumento ha ricevuto dalla macchina dati fuori sequenza.	Questo errore si verifica quando i dati ricevuti dallo strumento non sono nell'ordine corretto. Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema. Contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
<p>Communication protocol error</p> <p>A communication protocol error occurred with this run.</p>	<p>Errore del protocollo di comunicazione</p> <p>Si è verificato un errore nel protocollo di comunicazione con questo processo.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il protocollo di comunicazione configurato nel firmware non è quello previsto.</p> <p>Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema del protocollo di comunicazione o dello strumento.</p>
<p>Detector motor jam, stopped machine</p>	<p>Motore rilevatore bloccato, macchina ferma</p>	<p>Questo errore può verificarsi avviando il Rotor-Gene Q MDx immediatamente dopo la consegna in un clima freddo. In questo caso, attendere almeno un'ora affinché lo strumento si porti a temperatura ambiente prima di accenderlo.</p> <p>Se l'errore persiste, contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.</p>
<p>Fatal hardware malfunction</p> <p>The instrument detected that there was a fatal hardware malfunction. Do not attempt to re-use the machine until the machine has been serviced by your distributor.</p>	<p>Disfunzione fatale dell'hardware</p> <p>Lo strumento ha rilevato una disfunzione fatale nell'hardware. Non tentare di usare nuovamente la macchina prima dell'assistenza da parte del distributore.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il software rileva una disfunzione fatale dell'hardware e attiva una procedura di protezione di sicurezza per spegnere la macchina.</p> <p>Spegnere lo strumento immediatamente e contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.</p>

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
Machine error This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file.	Errore macchina Questo processo è stato arrestato perchè si sono verificati sulla macchina errori che non è stato possibile recuperare. Se questo si verifica di nuovo, contattare il distributore allegando un file d'archivio di supporto.	Questo errore si verifica quando il software rileva sulla macchina errori che non è stato possibile recuperare. Il software ha arrestato il processo. Provare un altro processo. Se il problema persiste, contattare il distributore o il servizio di assistenza tecnica QIAGEN allegando un file di archivio di supporto.

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
<p>Machine unplugged</p> <p>The instrument is not responding and failed with the message <ERROR MESSAGE >. This is an unrecoverable failure, please reset the instrument and restart the software.</p>	<p>Macchina non collegata</p> <p>Lo strumento non risponde e non funziona con il messaggio <ERROR MESSAGE > (MESSAGGIO D'ERRORE). Si tratta di una disfunzione irrecuperabile. Resettare lo strumento e riavviare il software.</p>	<p>Questo errore si verifica se lo strumento non comunica con il software dopo un intervallo di timeout definito. Spesso è causato da un difetto dello strumento o da un'attività eccessiva del PC che causa la perdita di un pacchetto.</p> <p>Le cause più comuni legate al software sono i task che impegnano intensivamente il processore, quali la protezione antivirus residente o le scansioni antivirus programmate, le schede per wireless o le schede per infrarossi.</p> <p>Disabilitare o disinstallare il relativo software/task che impegna il processore.</p> <p>Resettare lo strumento e riavviare il software.</p> <p>Contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN se il problema persiste.</p>

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
Machine unplugged The instrument is not connected to your computer on <PORT NAME>. Reconnect the serial cable to the back of the computer and then click Continue.	Macchina non collegata Lo strumento non è collegato al computer su <PORT NAME> (NOME PORTA). Ricollegare il cavo seriale sul retro del computer, poi cliccare su Continue.	Questo errore si verifica quando si perde la comunicazione seriale o USB con lo strumento. Ricollegare il cavo seriale o USB sul retro del computer, poi cliccare su Continue.
Object variable or with block variable not set	Variabile dell'oggetto o variabile con blocco non impostata	Questo errore si verifica al lancio del software se il file modello di default dell'esperimento è alterato. Questo può verificarsi se il software/computer sono stati arrestati senza uscire correttamente, per es. per un'interruzione dell'alimentazione. Cancellare il file C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret e poi riavviare il software.

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
<p>Rotor speed failure</p> <p>Time out while setting the rotor speed.</p>	<p>Errore velocità rotore</p> <p>Timeout durante l'impostazione della velocità del rotore.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il software tenta di impostare la velocità del rotore e non riesce entro un periodo di timeout.</p> <p>Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema.</p> <p>Contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.</p>
<p>Serial port in use</p> <p>The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry."</p>	<p>Porta seriale in uso</p> <p>La porta seriale attualmente è usata da un'altra applicazione. Chiudere tutte le applicazioni quali le comunicazioni o il software di sincronizzazione, poi riprovare.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il software tenta di collegare la macchina sulla porta COM configurata mentre la porta è usata da un altro software.</p> <p>Chiudere tutte le applicazioni quali le comunicazioni o il software di sincronizzazione, poi riprovare.</p>
<p>Shutdown timeout</p> <p>The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software.</p>	<p>Timeout durante lo spegnimento</p> <p>Lo strumento ha superato il tempo previsto per lo spegnimento. Resettare la macchina e resettare il software.</p>	<p>Questo errore si verifica quando il software invia un comando di spegnimento dello strumento e la macchina continua a rinviare dati dopo il periodo di attesa previsto.</p> <p>Resettare la macchina e riavviare il software.</p>

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
Temperature protection activated The instrument detected that the chamber temperature increased above a safe level. It has therefore entered a self-protection mode. Please turn off the instrument and contact your distributor if the problem persists.	Attivata protezione termica Lo strumento ha rilevato che la temperatura della camera ha superato un livello di sicurezza. Pertanto è andato in modo auto-protezione. Spegnerlo lo strumento e contattare il distributore se il problema persiste.	Questo errore si verifica quando il software rileva che la temperatura della camera ha superato il livello di sicurezza e quindi attiva una procedura di auto-protezione. Spegnerlo lo strumento immediatamente e contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.
Thermistor is open The instrument detected that the thermistor is open, and so to prevent damage to the machine, it has been turned off. Please contact your distributor if this occurs again.	Il termistore è aperto Lo strumento ha rilevato che il termistore è aperto e quindi è stato spento per evitare danni alla macchina. Contattare il distributore se questo si verifica di nuovo.	Questo errore si verifica quando il software rileva che il termistore è aperto e quindi non può leggere la temperatura; il software ha allora attivato una procedura di protezione di sicurezza per spegnere la macchina. Spegnerlo lo strumento immediatamente e contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.

Messaggio d'errore	Traduzione	Commenti e suggerimenti
<p>Unrecoverable errors occurred</p> <p>This run was stopped as machine errors occurred that could not be recovered from. Please contact your distributor if this occurs again, attaching a support archive file.</p>	<p>Si è verificato un errore irrecuperabile</p> <p>Questo processo è stato arrestato perchè si sono verificati sulla macchina errori che non è stato possibile recuperare. Se questo si verifica di nuovo, contattare il distributore allegando un file d'archivio di supporto.</p>	<p>Questo errore si verifica nel mezzo di un processo dopo che il software ha compiuto inutilmente ogni tentativo possibile di recupero.</p> <p>Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema.</p> <p>Contattare il distributore o l'assistenza tecnica QIAGEN.</p>

12.4 Messaggi di Rotor-Gene Q Software

Di seguito è riportato un elenco di messaggi d'uso, di avvertenza e di altro tipo che possono essere visualizzati nel software Rotor-Gene durante l'impiego del software e dell'hardware. Tutte le parti variabili del messaggio, ossia per es. le descrizioni caratteristiche dell'errore, sono tra parentesi (per es. < ERROR DESCRIPTION >) (DESCRIZIONE ERRORE).

Testo del messaggio

Messaggi generici

- Esiste già un canale grezzo per questa pagina. Se si vuole ricreare questa pagina, cancellare prima il canale grezzo mediante il pulsante "Options" e poi riprovare.
- Si è verificato un grave problema che richiede la chiusura del software. Dopo aver cliccato su "OK", il lavoro corrente sarà salvato e la macchina spenta, se possibile. Se il problema persiste, contattare il distributore.

Testo del messaggio

- 3 Impossibile cancellare questa pagina. Deve essere sempre presente almeno una pagina campione.
- 4 Impossibile collegare lo strumento sulla porta seriale <COMPORT>. Controllare che la macchina sia correttamente collegata sul retro del computer, poi riprovare.
- 5 Impossibile aprire la porta seriale <COMPORT> per collegare lo strumento. Controllare che non sia aperto nessun software di comunicazione, poi riprovare.
- 6 Non è stato possibile salvare il processo perché il modulo conteneva dati non validi. Verificare i dati immessi, poi riprovare.
- 7 Impossibile salvare il file. Confermare che il disco abbia spazio a sufficienza e sia esente da errori.
- 8 Non è stato possibile aprire l'applicazione e-mail. Verificare che sia stata correttamente installata sul computer.
- 9 Incontrato un errore durante il processo: <ERROR DESCRIPTION>. Il processo continua e viene registrato un messaggio nella scheda messaggi di "Run Info" (Info processo).
- 10 Strumento non rilevato. Verificare che lo strumento sia stato collegato correttamente e che sia stato acceso.
- 11 Logging attualmente disattivato a causa di un errore precedente. I log archiviati non possono essere visualizzati fino a che il software non sia stato riavviato.
- 12 Non è stato possibile normalizzare tutti i campioni a causa di un livello di fluorescenza troppo basso.
- 13 Possono essere importati solo i processi eseguiti con lo stesso rotore del processo corrente.
- 14 Attenzione, soltanto i file log del processo corrente sono indisponibili fino al suo completamento.
- 15 Immettere un numero valido di ripetizioni. Deve essere superiore a 0.

Testo del messaggio

- 16 Si sono incontrati problemi durante l'aggiornamento dei dati log. Il logging è stato disattivato, ma sarà riattivato al prossimo processo.
- 17 La firma del file di processo assicura l'integrità dei propri risultati. Le informazioni sulla firma del processo sono reperibili nella finestra "Run Info".
- 18 ID campione bloccata. Impossibile incollare su campioni bloccati.
- 19 TeeChart Office non è installato su questo computer. Reinstallare il software Rotor-Gene.
- 20 Non è stata selezionata la porta COM configurata per lo strumento. Si deve selezionare una porta COM.
- 21 Il file processo caricato contiene una firma non corrispondente al contenuto del file. Questo significa che il file è alterato, o che è stato manomesso da quando è stato scritto dal software Rotor-Gene.
- 22 Il file caricato è senza firma. Non è possibile garantire il contenuto di questo file.
- 23 Il numero di matricola della macchina non è valido. I numeri di matricola devono essere di almeno 6 cifre.
- 24 La macchina sarà ora fatta raffreddare fino a <TEMPERATURE> (TEMPERATURA) gradi. La camera e le superfici saranno ancora ad alta temperatura all'apertura della macchina. Fare molta attenzione e indossare guanti di protezione se si toccano superfici o tubi.
- 25 Le impostazioni regionali del computer usato sono in conflitto. Verificare la corrispondenza della valuta e dei separatori decimali.
- 26 Il numero di matricola immesso nella schermata di benvenuto <SERIAL NUMBER1> (MATRICOLA1) non corrisponde a quello memorizzato nella macchina collegata <SERIAL NUMBER2> (MATRICOLA2). Il numero di matricola del computer ora è stato aggiornato in modo da corrispondere alla macchina collegata.
- 27 C'è stato un problema di comunicazione con la scheda di comunicazione. Riavviare il computer e riprovare.

Testo del messaggio

- 28 Si è verificato un timeout nel tentativo di dialogo con lo strumento. Verificare che sia stato collegato correttamente.
- 29 Questa funzione non può essere usata in modo virtuale.
- 30 Questo file profilo è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente.
- 31 Questo file di processo è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti del processo potrebbero non essere caricati correttamente.
- 32 Questo file campione è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente.
- 33 Questo software eseguirà la simulazione basica di una macchina a scopo di istruzione e dimostrazione. È possibile disattivare questa impostazione tramite la schermata Setup, accessibile dal menu "File".
- 34 Questo modello è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti del modello potrebbero non essere caricati correttamente.
- 35 Impossibile caricare questo file campione perchè il layout delle provette non corrisponde. Caricare questi campioni prima di iniziare il processo.
- 36 Impossibile aprire la comunicazione con la macchina perchè un'altra applicazione sta già usando la porta <COMPORT>. Verificare che non siano in corso applicazioni che usano la stessa porta seriale, poi riprovare.
- 37 Si sono verificati errori irrecuperabili durante il tentativo di caricare il file. Il file non è stato caricato.
- 38 Impossibile arrestare il programma durante il processo.

Testo del messaggio

- 39 I diritti disponibili non sono sufficienti per usare il software. Contattare l'amministratore del dominio per impostare i gruppi.
- 40 Occorre eseguire un'analisi quantitativa prima di esportare i campioni.
- 41 Si deve selezionare una porta COM prima di continuare.
- 42 Non è stato possibile salvare il processo nella posizione di default. Nella finestra successiva, selezionare una posizione alternativa in cui salvarlo.
- 43 Le impostazioni sono state salvate. Fare clic su "OK" per chiudere il software.
- 44 Si deve selezionare un rotore prima di continuare.
- 45 Non è possibile avviare il processo se non è stata selezionata la casella per confermare che l'anello di bloccaggio è stato inserito.

Messaggi di aggiustamento dell'autogain

- 46 L'aggiustamento manuale del gain utilizza i canali definiti nel proprio profilo. Poichè nel profilo non sono stati definiti dei punti d'acquisizione, non è possibile eseguire la regolazione manuale del gain.
- 47 La temperatura immessa non è stata salvata perchè al di fuori del range della macchina. Immettere una temperatura valida.

Messaggi dell'editor

- 48 Immettere un codice di gruppo valido. I codici di gruppo devono avere un massimo di 5 caratteri, senza spazi nè virgole.
- 49 Immettere un nome di gruppo valido. I nomi di gruppo non possono contenere virgole, nè essere vuoti.

Messaggi della calibrazione della denaturazione ottica

Testo del messaggio

- 50 Impossibile da impostare come punto di denaturazione ottica a causa di una calibrazione fallita. Immettere un numero valido di secondi di sosta. Il valore deve essere positivo.
- 51 Non è stato possibile rilevare un picco di fusione durante la calibrazione della denaturazione ottica. Questo può essere dovuto al fatto che per la calibrazione è stata selezionata una provetta non corretta, o che per questo campione sono state usate sostanze chimiche inappropriate. Invece è stato usato un profilo Timed Step.

Messaggi OTV

- 52 Immettere un numero di matricola OTV valido per eseguire il processo.
- 53 Questo file di verifica della temperatura è stato alterato. Disinstallare e reinstallare il software Rotor-Gene per correggere questo errore.
- 54 Questo file di processo non è firmato correttamente. Non è possibile visualizzare i risultati.
- 55 Non è possibile avviare il processo se non è stata selezionata la casella per confermare che l'inserito fluorescente è stato inserito correttamente.
- 56 Questo rotore è scaduto. Contattare il distributore per ottenere una sostituzione.

Messaggi del menu sicurezza

- 57 Impossibile aprire il manager utenti/gruppi di Windows.
- 58 Impossibile creare gruppi.
- 59 Impossibile modificare gli account incorporati.

Menu di analisi

- 60 È stato selezionato un solo canale per l'analisi. Per selezionare più canali, tracciare un rettangolo intorno ai canali da visualizzare nella finestra di selezione analisi.

Testo del messaggio

- 61 Sono stati selezionati più canali per l'analisi. Questa tecnica di analisi permette di analizzare solo canali singoli.

Messaggi della misurazione della concentrazione

- 62 La misurazione della concentrazione esegue l'ottimizzazione automatica del gain nella prima posizione del rotore. Verificare che lo standard di concentrazione massimo sia nella prima posizione del rotore.

Messaggi di analisi Endpoint

- 63 Per usare l'analisi nel punto finale si devono avere controlli positivi e negativi in ogni canale. Per definire questi controlli, fare clic su "OK".
- 64 Non è stato definito nessun controllo positivo. Si devono definire controlli positivi per ogni canale che si sta analizzando.
- 65 Non è stato definito nessun controllo negativo. Si devono definire controlli negativi per ogni canale che si sta analizzando.
- 66 Non è stato definito nessun controllo NTC. Si devono definire controlli NTC per ogni gruppo.

Messaggi dell'analisi HRM

- 67 Per il genotipo <GENOTYPE NAME> (NOME GENOTIPO) non è stato definito un controllo.
- 68 Non sono consentite combinazioni duplicate di genotipi.
- 69 Le fusioni ad alta risoluzione non sono supportate da questo strumento. Consigliamo di chiedere maggiori informazioni al distributore.

Messaggi dell'analisi di fusione

- 70 Non è possibile definire i genotipi fino a che non siano stati assegnati i bin. Definire tutti i bin, poi riprovare.
- 71 Immettere un'abbreviazione per il genotipo <GENOTYPE NAME>.

Testo del messaggio

Messaggi dell'analisi con grafico di dispersione

- 72 L'analisi con grafico di dispersione richiede di selezionare esattamente 2 canali. Per selezionare più canali, tracciare un rettangolo intorno ai canali da visualizzare nella finestra di selezione analisi, oppure cliccare su ciascun canale tenendo premuto il tasto SHIFT.

Messaggi dell'analisi di quantificazione

- 73 La funzione Auto-find Threshold richiede che siano stati definiti almeno 2 standard selezionati. Per questa impostazione, cliccare con il tasto destro sulla lista campioni e selezionare "Edit Samples..."

13 Glossario

Termine	Descrizione
Acquisizione	L'acquisizione è la raccolta di dati sulla fluorescenza. Ogni acquisizione (serie di dati di fluorescenza) da un canale è visualizzata nel software come dati non analizzati in una finestra "Raw channel" (Canale dati grezzi). Questi dati possono essere analizzati utilizzando le opzioni del menu "Analysis".
Anello di bloccaggio	Gli anelli di bloccaggio sono anelli metallici che si installano sul rotore per evitare la fuoriuscita di provette e tappi mentre il Rotor-Gene Q MDx è in funzione. Le provette e i tappi fuoriusciti potrebbero danneggiare lo strumento.
Bin	In un'analisi di fusione, si fissano i bin per definire una regione in cui si prevede un picco di fusione. I genotipi possono essere definiti in base alla presenza di picchi in certi bin o certe combinazioni di bin.
Blocco di caricamento	I blocchi di caricamento sono blocchi in alluminio disponibili in diversi formati usati per alloggiare le provette o i Rotor-Disc durante il setup della reazione. I blocchi di caricamento Rotor-Disc sono utilizzati anche con il termosigillatore Rotor-Disc.
Canale	Un canale consiste in un diodo ad emissione luminosa (LED) con un filtro di eccitazione accoppiato a un filtro di emissione. Il LED e il filtro di eccitazione eccitano i campioni ad una data lunghezza d'onda. La fluorescenza emessa dai campioni passa attraverso un filtro di emissione, prima di essere rilevata da un fotomoltiplicatore.
CE-IVD	Conformità con la Direttiva Europea per dispositivi medici in vitro 98/79/CE.

Termine	Descrizione
Gain	Il Rotor-Gene Q MDx usa un fotomoltiplicatore per raccogliere i fotoni della fluorescenza e convertirli in segnali elettronici. Il gain è un'impostazione che determina la sensibilità del fotomoltiplicatore. Se il gain è impostato troppo alto, il segnale è sovrasaturato. Se il gain è impostato troppo basso, non è possibile distinguere il segnale dal rumore di fondo.
Ottimizzazione gain	L'ottimizzazione del gain è un processo che regola in modo dinamico le impostazioni del gain, permettendo di selezionare un'impostazione appropriata che dia un rilevamento ottimale del segnale.
Rotor-Disc	I Rotor-Disc sono piastre circolari di pozzetti di reazione orientati verticalmente. Sono disponibili Rotor-Disc nei formati per 72 e 100 reazioni. Per sigillare i Rotor-Disc si usano l'apposita pellicola sigillante Rotor-Disc Heat Sealing Film e il termosigillatore Rotor-Disc Heat Sealer.
Rotore	Il rotore in metallo contiene le provette o i Rotor-Disc nel Rotor-Gene Q MDx. Permette la centrifugazione dei campioni nella camera dello strumento e garantisce il corretto allineamento dei campioni con il sistema ottico. Il rotore viene fissato con un anello di bloccaggio.

Appendice A

Dati tecnici

QIAGEN si riserva il diritto di modificare le specifiche in qualsiasi momento.

Condizioni ambientali

Condizioni di funzionamento

Alimentazione	100–240 V AC, 50–60Hz, 520 VA (picco) Consumo di corrente 60 VA (standby) Le fluttuazioni della tensione di rete non devono essere superiori al 10% delle tensioni di alimentazione nominali.
Fusibile	Fusibile F5A 250 V
Dissipazione termica/ carico termico	Media: 0,183 kW (632 BTU/ora) Picco: 0,458 kW (1578 BTU/ora)
Categoria di sovratensione	II
Temperatura ariada	18 a 30°C
Umidità relativa	10-75% (senza condensa)
Altitudine	Fino a 2000 m
Luogo di funzionamento	Destinato unicamente all'uso in interni
Livello di inquinamento	2
Classe ambientale	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

Condizioni per il trasporto

Temperatura aria -25°C a 60°C nella confezione originaria

Umidità relativa Max. 75% (senza condensa)

Classe 2K2 (IEC 60721-3-2)
ambientale

Condizioni di conservazione

Temperatura aria 15°C a 30°C nella confezione originaria

Umidità relativa Max. 75% (senza condensa)

Classe 1K2 (IEC 60721-3-1)
ambientale

Dati meccanici e caratteristiche hardware

Dimensioni Larghezza: 370 mm
 Altezza: 286 mm
 Profondità (senza cavi): 420 mm
 Profondità (sportello aperto): 538 mm

Peso 12,5 kg nella configurazione standard

Capacità Fino a 100 campioni per ogni processo utilizzando un Rotor-Disc 100

Software Software Rotor-Gene Q (versione 2.3.1 o superiore)

Specifiche termiche

Descrizione	Specifiche
Intervallo di temperatura	Da 35°C a 99°C (da 50°C a 99°C per applicazioni di processo)
Precisione temperatura	$\pm 0,5^\circ\text{C}$ (calibrata utilizzando la procedura Rotor-Disc OTV)
Risoluzione termica	$\pm 0,02^\circ\text{C}$ (incremento minimo programmabile)
Uniformità di temperatura	$\pm 0,02^\circ\text{C}$

Specifiche ottiche

Descrizione	Specifiche
Fonti di eccitazione	Diodi ad emissione luminosa ad alta energia.
Rilevatore	Fotomoltiplicatore
Tempo di acquisizione	4 s

Dichiarazione FCC

La "United States Federal Communications Commission" (USFCC) (in 47 CRF 15. 105) ha dichiarato che gli utenti di questo prodotto devono essere informati dei seguenti fatti e circostanze.

"Il presente dispositivo è conforme alla parte 15 di FCC: Il funzionamento è soggetto alle seguenti due condizioni: (1) Il presente dispositivo non può causare interferenze nocive e (2) il presente dispositivo deve accettare qualsiasi interferenza ricevuta, incluse le interferenze che possono causare un funzionamento indesiderato."

"Questo apparecchio digitale di Classe B è conforme alla norma canadese ICES-0003."

La seguente dichiarazione è applicabile ai prodotti trattati nel presente manuale, salvo se diversamente specificato nello stesso. La dichiarazione per altri prodotti sarà riportata nella rispettiva documentazione di accompagnamento.

Nota: il presente apparecchio è stato testato e riscontrato conforme ai limiti applicabili a un dispositivo digitale di Classe B, ai sensi della Parte 15 delle norme FCC e soddisfa tutti i requisiti della norma

canadese ICES-003 relativa alle apparecchiature digitali che causano interferenze. Questi limiti sono volti a fornire una ragionevole protezione da interferenze nocive in un'installazione residenziale. Questo apparecchio genera, utilizza e può irradiare energia in radio frequenza e, se non installato e utilizzato nel rispetto delle presenti istruzioni, può causare interferenze nocive alle comunicazioni radio. Tuttavia, non sussiste alcuna garanzia che le interferenze non si verifichino in una particolare installazione. Se il presente apparecchio non causa interferenze nocive alla ricezione radio o televisiva eventualmente determinate dallo spegnimento e dall'accensione dell'apparecchio, si invita l'utente a tentare di correggere le interferenze mediante uno o più dei seguenti provvedimenti:

- Riorientare o riposizionare l'antenna ricevente.
- Aumentare la distanza tra l'apparecchio e il ricevitore.
- Collegare l'apparecchio a una presa su un circuito diverso da quello al quale è connesso il ricevitore.

Consultare il rivenditore o un tecnico radio/TV esperto per ricevere assistenza.

QIAGEN GmbH Germania non è da ritenersi responsabile per eventuali interferenze radiotelevisive causate dalla modifica non autorizzata del presente apparecchio o dalla sostituzione o collegamento di cavi di connessione e apparecchi diversi da quelli specificati da QIAGEN GmbH, Germania. L'utente sarà responsabile di correggere l'interferenza causata da tali modifiche, sostituzioni o collegamenti non autorizzati.

Dichiarazione di conformità

Declaration of Conformity

Name and address of the company

**QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
D-40724 Hilden
Germany**

We herewith declare that the product

Rotor-Gene Q MDx

Accessories: **Rotor-Gene Heat Sealer**

meets all applicable requirements of the European Directive on

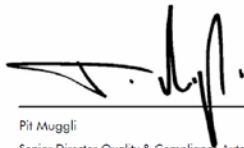
In vitro diagnostic medical devices (IVDD) 98/79/EC

Classification

Other Device, Annex III

Hombrechtikon, 01 November 2010




Pit Muggli
Senior Director Quality & Compliance Automated Systems



Sample & Assay Technologies

Direttiva sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici (WEEE)

La presente sezione fornisce informazioni sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici da parte degli utenti.

Il simbolo raffigurante una croce sul cassonetto dei rifiuti (vedere di seguito) indica che questo prodotto non può essere smaltito tra i normali rifiuti; deve essere portato presso un impianto approvato di trattamento dei rifiuti o presso un punto di riciclaggio autorizzato, conformemente alle leggi e ai regolamenti locali.

La raccolta differenziata e il riciclaggio dei rifiuti elettronici al momento dello smaltimento garantiscono la conservazione delle risorse naturali e assicurano che il prodotto venga riciclato nel rispetto della tutela della salute dell'uomo e dell'ambiente.



Su richiesta, QIAGEN può fornire il riciclaggio a un costo supplementare. Nell'Unione Europea, conformemente ai requisiti specifici WEEE e laddove sia fornito un prodotto sostitutivo, QIAGEN provvede al riciclaggio gratuito della sua apparecchiatura elettronica marcata WEEE.

Per riciclare le apparecchiature elettroniche, contattare l'ufficio vendite QIAGEN locale per il modulo di restituzione richiesto. Una volta compilato il modulo, sarete contattati da QIAGEN per informazioni di follow-up al fine di organizzare il ritiro dell'apparecchiatura da smaltire, o per proporvi un'offerta individuale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Appendice B

La presente appendice descrive più dettagliatamente le tecniche matematiche applicate.

Quantificazione

Le concentrazioni calcolate sono ottenute da un modello di regressione lineare semplice, i cui valori noti sono le concentrazioni logaritmiche (x) e i valori sperimentali i valori C_T (y).

Le concentrazioni logaritmiche e i valori C_T degli standard sono utilizzati per costruire un modello nella forma:

$$y = Mx + B$$

Intervalli di confidenza per le concentrazioni calcolate

Usiamo il seguente intervallo di confidenza $100(1 - \alpha)\%$ per una stima di una nuova osservazione x_0 dalla curva standard.

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Questo è l'intervallo di confidenza per la concentrazione di una singola incognita.

Supponiamo ora di avere k ulteriori osservazioni a $x = x_0$ e denotiamo la loro media con \bar{Y}_0 . Allora,

$$\bar{Y}_0 \sim N(\beta_0 + \beta_1 x_0, \frac{\sigma^2}{k})$$

e argomenti simili a quanto sopra danno

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

Questa formula stabilisce come determinare gli intervalli di confidenza per le concentrazioni di incognite replicate.

Per la stima degli standard, si può ottenere un intervallo di confidenza più ristretto:

$$\frac{Y_0 - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \pm \frac{S}{\hat{\beta}_1} \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)^{\frac{1}{2}} t_{n-2, \alpha/2}$$

La formula implica che, aggiungendo replicati a una concentrazione individuale standard, si riduce l'ampiezza dell'intervallo per tutte le stime, in quanto n aumenta. Aggiungendo un gran numero di replicati a un'incognita se ne riduce l'incertezza a quella di un singolo standard. I replicati extra riducono l'incertezza grazie al fatto che l'incognita non fa parte del modello lineare.

Intervalli di confidenza per valori C_T

Ipotizziamo che l'errore nei valori replicati C_T sia lineare e normalmente distribuito.

Usiamo pertanto l'intervallo di confidenza t per un campione. Sia μ il valore medio dei valori C_T di un replicato

$(x_0 \dots x_{n-1})$. Allora, un intervallo di confidenza $100(1-\alpha)\%$ per un valore $C_T \mu$ è:

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

Desideriamo ringraziare Peter Cook della Facoltà di Matematica dell'Università del NSW di Sydney, Australia, per il suo prezioso aiuto nella verifica dei metodi matematici utilizzati.

Appendice C

Prodotti, accessori e prodotti di consumo Rotor-Gene Q MDx

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Rotor-Gene Q MDx 2plex	Termociclatore per PCR in tempo reale a 2 canali (verde, giallo), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore ad alta risoluzione (High Resolution Melt analyzer) a 2 canali (verde, giallo) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Termociclatore per PCR in tempo reale a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Termociclatore per PCR in tempo reale e analizzatore ad alta risoluzione (High Resolution Melt analyzer) a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Termociclatore per PCR in tempo reale a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), comprendente notebook, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e materiali	Chiedere

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Accessori		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Il kit contiene: 2 confezioni di Rotor-Disc 100, termosigillatore Rotor-Disc Heat Sealer, pellicola Rotor-Disc Heat Sealing Film, rotore Rotor-Disc 100 e anello di bloccaggio, blocco di caricamento Rotor-Disc 100, pipettatore Rotor-Disc Pipetting Aid	Chiedere
Rotor-Disc 100 (30)	30 dischi confezionati individualmente per 3000 reazioni	981311
Rotor-Disc 100 (300)	10 x 30 dischi confezionati individualmente per 30.000 reazioni	981313
Rotor-Disc 100 Rotor	Per tenere i dischi Rotor-Disc 100 nel Rotor-Gene Q MDx; richiede l'anello di bloccaggio per Rotor-Disc 100	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Per bloccare un Rotor-Disc 100 nel rotore Rotor-Disc 100	9018896
Rotor-Disc 100 Loading Block	Blocco in alluminio per setup manuale e automatico della reazione nei dischi Rotor-Disc 100	9018909
Rotor-Disc Pipetting Aid	Strumento per marcare il pozzetto durante il setup manuale della reazione su un Rotor-Disc Loading Block	9018897
Rotor-Disc Heat Sealer	Strumento per termosigillatura da usare con i Rotor-Disc; richiede il blocco di caricamento Rotor-Disc 72 o 100	9018898
Rotor-Disc Heat Sealing Film (60)	60 pellicole per sigillatura dei dischi Rotor-Disc 100 o Rotor-Disc 72	981601
Rotor-Disc Heat Sealing Film (600)	10 x 60 pellicole per sigillatura dei dischi Rotor-Disc 100 o Rotor-Disc 72	981604

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Il kit contiene: 3 confezioni di Rotor-Disc 72, termosigillatore Rotor-Disc Heat Sealer, pellicola Rotor-Disc Heat Sealing Film, rotore Rotor-Disc 72 e anello di bloccaggio, blocco di caricamento Rotor-Disc 72, pipettatore Rotor-Disc Pipetting Aid	Chiedere
Rotor-Disc 72 (24)	24 dischi confezionati individualmente per 1728 reazioni	981301
Rotor-Disc 72 (240)	10 x 24 dischi confezionati individualmente per 17.280 reazioni	981303
Rotor-Disc 72 Rotor	Per tenere i dischi Rotor-Disc 72 nel Rotor-Gene Q MDx; richiede l'anello di bloccaggio per Rotor-Disc 72	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	Per bloccare un Rotor-Disc 72 nel rotore Rotor-Disc 72	9018900
Rotor-Disc 72 Loading Block	Blocco in alluminio per setup manuale e automatico della reazione nei dischi Rotor-Disc 72	9018910
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
72-Well Rotor	Per provette per strisce e tappi da 0,1 ml; richiede l'anello di bloccaggio per il rotore a 72 pozzetti	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Per bloccare le provette per strisce e tappi da 0,1 ml nel rotore a 72 pozzetti	9018904
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione con pipetta a un canale in 72 provette x 0,1 ml	9018901

Appendice C

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Loading Block 72 x 0,1 ml Multi-channel	Blocco in alluminio per setup della reazione con pipetta multicanale in 72 provette x 0,1 ml	9018902
PCR Tubes, 0,2 ml (1000)	1000 provette a parete sottile per 1000 reazioni	981005
PCR Tubes, 0,2 ml (10000)	10 x 1000 provette a parete sottile per 10.000 reazioni	981008
36-Well Rotor	Per provette PCR, 0,2 ml; richiede l'anello di bloccaggio per il rotore a 36 pozzetti	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	Per bloccaggio di provette PCR, 0,2 ml, nel rotore a 36 pozzetti	9018906
Loading Block 96 x 0,2 ml Tubes	Blocco in alluminio per setup manuale della reazione in una serie standard 8 x 12 con 96 provette x 0,2 ml	9018905
Rotor-Disc OTV Kit	Kit per la verifica ottica della temperatura dei sistemi Rotor-Gene, include un Rotor-Disc precaricato con cristalli liquidi termocromatici, inserti fluorescenti, CD con file di calibrazione; richiede Rotor-Disc 72 Rotor e Anello di bloccaggio o kit starter Rotor-Disc 72	981400
Rotor Holder	Supporto metallico indipendente per assemblare le provette e i Rotor-Disc nei rotori	9018908

Per un elenco aggiornato dei kit QIAGEN indicati per l'uso con il Rotor-Gene Q MDx, consultare la pagina Web www.qiagen.com/products/rotor-geneqmdx.aspx.

Appendice D

Clausola di responsabilità limitata

QIAGEN sarà sollevata da tutti gli obblighi ai sensi della presente garanzia nel caso in cui vengano eseguite riparazioni o modifiche da persone diverse dal proprio personale, eccetto qualora la Società abbia dato il proprio consenso scritto ad eseguire tali riparazioni o modifiche.

Tutti i materiali sostituiti ai sensi della presente garanzia saranno coperti da garanzia unicamente durante il periodo di garanzia originale e in nessun caso oltre la data di scadenza originale della garanzia originale, salvo autorizzazione scritta concessa da un funzionario della Società. I dispositivi di lettura, di interfaccia e il software collegato saranno garantiti solo per il periodo proposto dal fabbricante originale di tali prodotti. Eventuali dichiarazioni e garanzie rilasciate da chiunque, inclusi i rappresentanti di QIAGEN, che siano incoerenti o in conflitto con la presente garanzia non saranno vincolanti per la Società salvo accordo scritto e approvato da un funzionario QIAGEN.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Indice analitico

A

Acquisizione 6-15
Adjust scale 7-2
Ambiente 1-5
Amplificazione esponenziale 7-34
Analisi curva di fusione
 bin 7-48
 picchi 7-48
Analisi della concentrazione 7-68
 standard 7-69
Analisi della curva di fusione 7-46
Analisi EndPoint
 controlli 7-63
Analisi EndPoint 7-60
Analisi Scatter graph 7-56
Anello di bloccaggio
 Rotor-Disc 100 5-3
 Rotor-Disc 72 5-2
 rotore a 36 pozzetti 5-1
 rotore a 72 pozzetti 5-2
Assistenza tecnica 2-1
Attenzione 1-1
Audit trail 7-112
Auto-find threshold 7-23
Autoscale 7-2
AutoStat 7-28
Avvertenze 1-1

B

Barra degli strumenti 7-1
Bloccaggio
 campioni 7-115
 modelli 7-117
Blocco di caricamento 5-4

C

Calcolo di C_T 7-21
Canali 3-6, 7-75
Canali dati grezzi 7-1

Ciclo di denaturazione ottica 6-19
Coefficiente di correlazione 7-17
Conservazione 2
Correzione della pendenza del rumore
 7-30, 7-58
Ct Comment 7-25
Curva standard
 calcolo 7-18
 esportazione 7-17
 formula 7-17, 7-35
 importazione 7-19
 metodo della curva a due standard
 7-36
 sovrapposizione 7-18
Curva standard 7-15
Cycling 6-14

D

Default scale 7-2
Dimeri di primer 11-21
Discriminazione allelica 7-54
Disimballaggio 4-3
Disposizione provette 7-77

E

Efficienza 7-17, 7-34
Elimina cicli 7-3
Eliminazione scarti 1-7
Empty Run 6-8
Esportazione
 dati 8-5
 formato nativo 8-4
 grafici 8-2
 in LinReg 7-10

F

Finestra di setup 7-11
Finestra Edit profile 6-5, 6-12
Finestra Edit samples 6-7, 6-32, 7-80
stile rotore 7-87

Finestra Quantitation results (Risultati quantitativi) 7-23
Finestra Report browser 7-11, 7-15, 7-49
Finestra risultati curva di fusione 7-49
Finestra Sample page suitability 7-88
Fluorofori rilevati 3-6
Funzionamento
 condizioni 1-5, 1
 hardware 5-1
 software 6-1
Fusione 6-17

G

Genotipi
 analisi della curva di fusione 7-49
 analisi endpoint 7-61, 7-67
 analisi Scatter graph 7-58
 discriminazione allelica 7-56
Grafico temperatura 7-78
Gruppi 7-89

H

Hold 6-13
HRM
 analisi 7-71, 11-1, 11-21
 analisi della metilazione 11-6
 ciclo 6-18
 genotipizzazione di SNP 11-4
 kit 11-3
 linee guida 11-7
 PCR in tempo reale 11-20
 preparazione del campione 11-10
 procedura guidata avanzata 6-9
 procedura guidata Quick Start 6-3
 risoluzione problemi 12-1
 software 11-10

I

Ibridazione 6-17
Icona chiave inglese 8-6
Idoneità 7-88
Ignore first 7-31, 7-58

Impostazioni gain 7-118
Installazione 4-1
 hardware 4-4
 requisiti del PC 4-2
 requisiti del sito d'installazione 4-1
 requisiti di alimentazione 4-2
 requisiti di messa a terra 4-2
 software 4-6
Intervalli di confidenza 2

L

LinReg
 esportazione in 7-10
Log Archives 12-1
Long range (Range lungo) 6-15

M

Manutenzione 9-1
 procedura guidata avanzata 6-9
Menù
 analisi 7-13
 file 7-6
 finestra 7-119
 gain 7-118
 guida 7-119
 processo 7-73
 sicurezza 7-91
 visualizzazione 7-74
 visualizzazione opzioni 7-90
Messaggi 7-75
Messaggio d'errore 12-3
Metodo della curva a due standard 7-36
Modelli
 aggiunta alla procedura guidata avanzata 6-9
 aggiunta alla procedura guidata Quick Start 6-3
 analisi di fusione 7-50, 8-1
 analisi endpoint 7-68, 8-1
 analisi Scatter graph 7-59, 8-1
 discriminazione allelica 7-56, 8-1
 quantificazione 7-36, 8-1

N

- Normalizzazione 7-3
 - analisi endpoint 7-64
 - provetta dinamica 7-30, 7-58
- Normalizzazione con provetta dinamica 7-30, 7-58
- Nucleic Acid Concentration Measurement 6-3, 7-68
- Numero di matricola 4-9

O

- Opzioni macchina 7-74
- Ottimizzazione gain 6-11, 6-24
 - manuale 6-29
- OTV 10-1
- Outlier removal 7-32
- Outlook 7-124

P

- Pagina 7-3, 7-5, 7-84
- Parametri di eccitazione 3-6
- Parametri di rilevamento 3-6
- Pendenza 7-34
- Perform Last Run 6-2, 6-8
- Performance termica 3-3
- Porta 4-9, 7-12
- Procedura guidata Advanced 6-7
- Procedura guidata Quick Start 6-1
- Processo
 - apertura 7-8
 - arresto 7-73
 - avvio 7-73
 - firme 7-113
 - impostazioni 7-74
 - nuovo 7-7
 - pausa 7-73
 - salvare 7-8
- Progresso del profilo 7-79

Q

- Quantificazione 7-15, 1
- Quantificazione comparativa 7-51

- Quantificazione relativa delta delta C_T 7-42
- Quenched FRET 6-3

R

- Replicato del calibratore 7-52
- Risoluzione dei problemi 12-1
- Risoluzione problemi HRM 12-1
 - Rotor-Gene Q MDx 12-3
- Rotor-Disc
 - preparazione 5-9
 - termosigillatura 5-9
- Rotor-Disc 100 5-3
- Rotor-Disc 72 5-2
- Rotor-Disc OTV Kit 10-2
- Rotore
 - 36 pozzetti 5-1
 - 72 pozzetti 5-2
 - Rotor-Disc 100 5-3
 - Rotor-Disc 72 5-2
 - selezione 6-4, 6-9
 - specifiche 5-4
 - tipi 5-1

S

- Safety
 - rotor 1-8
- Scala 8-1
- Setup della reazione 5-4
- Sicurezza 7-77, 7-91
 - agenti chimici 1-7
 - biologica 1-5
 - campioni 1-6
 - elettrica 1-4
 - eliminazione scarti 1-7
 - fumi tossici 1-7
 - manutenzione 1-9
 - pericoli meccanici 1-8
 - pericolo termico 1-9
 - uso corretto 1-2
- Simboli 1-10
- Sistema ottico 3-5
- Software

aggiornamenti 4-12
messaggi di errore 12-11
versione 4-10
Soglia 7-22
Specifiche
 hardware 2
 ottiche 3
 termiche 3
Supporto 7-120

T

TeeChart Office 8-4, 8-7
Three Step with Melt 6-2, 6-8
Tipo campioni 7-83
Toggler 7-3
Touchdown 6-15
Trasporto 2

Two step 6-2, 6-9

U

Uso previsto 2-2
Utente
 account multipli 7-111
 assegnazione ruoli 7-98, 7-106
 creazione di un account 7-94, 7-104

V

Verifica ottica temperatura 10-1
Versione 2-2
Virtual mode 4-9, 7-12

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com