

Febbraio 2022

Manuale utente CE del Rotor-Gene[®] Q MDx



IVD

CE

REF

9002022, 9002032, 9002042



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R1

Indice

1	Introduzione	8
1.1	Informazioni sul presente manuale utente	8
1.2	Informazioni generali	9
1.2.1	Assistenza tecnica	9
1.2.2	Politica aziendale	9
1.2.3	Gestione delle versioni	10
1.3	Uso previsto del Rotor-Gene Q MDx	10
1.3.1	Requisiti per il Rotor-Gene Q MDx	10
1.4	Materiali richiesti	11
1.5	Materiali necessari ma non in dotazione	11
2	Informazioni sulla sicurezza	12
2.1	Uso corretto	13
2.2	Sicurezza elettrica	15
2.3	Sicurezza biologica	16
2.4	Sicurezza chimica	17
2.5	Smaltimento dei materiali di scarto	18
2.6	Pericoli meccanici	18
2.7	Sicurezza durante la manutenzione	20
2.8	Simboli sul Rotor-Gene Q MDx	21
3	Descrizione generale	22
3.1	Principio del Rotor-Gene Q MDx	22
3.1.1	Performance termica	22
3.1.2	Sistema ottico	23
3.1.3	Canali disponibili	24
3.2	Funzioni esterne del Rotor-Gene Q MDx	25
3.2.1	Sfiati per l'aria sul coperchio	25
3.2.2	Manico del coperchio	25
3.2.3	Camera rotore	25
3.2.4	Spie di stato dello strumento	25

3.3	Funzioni interne del Rotor-Gene Q MDx	26
3.3.1	Mozzo del rotore	26
3.3.2	Lente ottica	26
	Lente ottica sulla quale è centrato il diodo luminoso di eccitazione sulle provette	26
4	Procedure di installazione	27
4.1	Consegna e installazione del sistema	27
4.1.1	Disimballaggio del Rotor-Gene Q MDx	27
4.1.2	Installazione dell'hardware	28
4.1.3	Installazione del software	29
4.1.4	Versione software	32
4.1.5	Software aggiuntivo sui computer connessi agli strumenti Rotor-Gene Q MDx	32
4.2	Requisiti del sito	39
4.3	Collegamento all'alimentazione CA	40
4.3.1	Requisiti di alimentazione	40
4.3.2	Requisiti di messa a terra	40
4.3.3	Installazione del cavo di alimentazione CA	40
4.4	Configurazione per la sicurezza in Windows	40
4.5	Requisiti relativi alla stazione di lavoro	42
4.6	Disimballaggio installazione del Rotor-Gene Q MDx	43
4.6.1	Aggiornamento software	44
4.7	Accessori	44
4.8	Riconfezionamento e spedizione del Rotor-Gene Q MDx	44
4.9	Guida introduttiva	44
4.9.1	Accensione del Rotor-Gene Q MDx e della stazione di lavoro	44
5	Procedure di funzionamento	45
5.1	Uso del software Rotor-Gene Q MDx	45
5.1.1	Procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido)	45
5.1.2	Procedura guidata Advanced (Avanzata)	49
5.2	Uso dell'hardware del Rotor-Gene Q MDx	67
5.2.1	Tipi di rotore	67

5.2.2	Setup della reazione	70
5.2.3	Preparazione del Rotor-Disc	73
6	Interfaccia utente analisi	77
6.1	Spazio di lavoro	77
6.2	Barra degli strumenti	77
6.3	Visualizzazione canali dati grezzi	77
6.4	Passaggio da un campione all'altro	78
6.5	Menu File	80
6.5.1	Nuovo	80
6.5.2	Apri e Salva	81
6.5.3	Report	82
6.5.4	Setup	83
6.6	Menu Analisi	83
6.6.1	Analisi	83
6.6.2	Quantificazione	85
6.6.3	Curva a due standard	97
6.6.4	Quantificazione relativa delta delta C _T	101
6.6.5	Analisi della curva di fusione	104
6.6.6	Quantificazione comparativa	107
6.6.7	Discriminazione allelica	109
6.6.8	Analisi con grafico di dispersione	111
6.6.9	Analisi EndPoint	112
6.6.10	Analisi della concentrazione	119
6.6.11	Analisi di fusione ad alta risoluzione	122
6.7	Menu di processo	123
6.7.1	Avvia processo	123
6.7.2	Sospendi processo	123
6.7.3	Arresta processo	124
6.8	Menu Visualizza	124
6.8.1	Impostazioni processo	124
6.8.2	Grafico temperatura	127

6.8.3	Progresso del profilo	128
6.8.4	Modifica campioni	129
6.8.5	Opzioni di visualizzazione	135
6.9	Protezione dell'accesso per il software Rotor-Gene Q	135
6.9.1	Configurazione per Windows 7	136
6.9.2	Configurazione per Windows 10	141
6.9.3	Gestione di più utenti sullo stesso computer	144
6.9.4	Registrazione delle operazioni effettuate	145
6.9.5	Firme dei processi	147
6.9.6	Blocco dei campioni	148
6.9.7	Modelli bloccati	150
6.10	Menu Gain	150
6.11	Menu Finestra	151
6.12	Funzione di guida	151
6.12.1	Invia e-mail per supporto	152
7	Funzioni aggiuntive	156
7.1	Modelli di analisi	156
7.2	Apertura di un secondo processo	156
7.3	Opzioni di scala	156
7.4	Esportazione di grafici	157
7.5	Icona chiave inglese	160
7.6	Opzioni dell'area selezionata	161
8	Manutenzione	162
8.1	Pulizia della superficie del Rotor-Gene Q MDx	162
8.2	Decontaminazione della superficie del Rotor-Gene Q MDx	163
8.3	Riparazione del Rotor-Gene Q	163
9	Verifica ottica temperatura	164
9.1	Principio OTV	164
9.2	Componenti del Rotor-Disc OTV Kit	164
9.3	Esecuzione di un OTV	165
10	Analisi di fusione ad alta risoluzione	168

10.1	Strumentazione	169
10.2	Sostanze chimiche	170
10.3	Esempio di genotipizzazione di SNP	170
10.4	Esempio di analisi della metilazione	172
10.5	Linee guida per la riuscita dell'analisi HRM	173
10.6	Preparazione dei campioni	175
10.7	Preparazione del software	175
10.8	Analisi real-time PCR dei dati	181
10.9	Analisi dei dati HRM	182
11	Risoluzione dei problemi	186
11.1	Log Archives	187
11.2	Errori hardware e software	187
11.2.1	Risoluzione dei problemi in HRM	187
11.3	Messaggi di errore e avvertenze	188
11.3.1	Errori generali dello strumento	188
11.3.2	Messaggi del software Rotor-Gene Q	190
12	Glossario	195
13	Specifiche tecniche	196
13.1	Condizioni ambientali – condizioni operative	196
13.2	Condizioni per il trasporto	196
13.3	Condizioni per la conservazione	196
13.4	Dati meccanici e caratteristiche hardware	196
13.5	Specifiche (hardware e software)	197
13.5.1	Specifiche termiche	197
13.5.2	Specifiche ottiche	197
14	Appendice A – Informazioni legali	198
14.1	Dichiarazione FCC	198
14.2	Conformità allo standard IEC EN 61326	199
14.3	Dichiarazione di conformità	200
14.4	Direttiva sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE)	201

14.5	Clausola di responsabilità limitata	202
14.6	Contratto di licenza del software	203
15	Appendice B – Tecniche matematiche	206
15.1	Quantificazione	206
15.1.1	Intervalli di confidenza per le concentrazioni calcolate	206
15.1.2	Intervalli di confidenza per valori CT	207
16	Informazioni per gli ordini	208
16.1	Prodotti, accessori e prodotti di consumo Rotor-Gene Q MDx	208
17	Cronologia delle revisioni del documento	211

1 Introduzione

Grazie per aver scelto lo strumento Rotor-Gene Q MDx. Siamo certi 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 contenute nel manuale utente devono essere rispettate per garantire il funzionamento sicuro dello strumento e per mantenere lo stesso in condizioni di sicurezza.

Notare che il Rotor-Gene Q MDx viene fornito in più configurazioni. Per i dettagli, incluse le informazioni per gli ordini, vedere la sezione 16.

1.1 Informazioni sul presente manuale utente

Il presente manuale utente fornisce informazioni sul Rotor-Gene Q MDx nelle seguenti sezioni:

- Introduzione
- Informazioni sulla sicurezza
- Descrizione generale
- Procedure di installazione
- Procedure di funzionamento
- Manutenzione
- Risoluzione dei problemi
- Specifiche tecniche
- Appendici

Le appendici contengono le seguenti informazioni:

- Appendice A – Informazioni legali
- Appendice B – Tecniche matematiche

1.2 Informazioni generali

1.2.1 Assistenza tecnica

QIAGEN® è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio servizio di assistenza tecnica. Il nostro reparto di assistenza tecnica è costituito 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. Per eventuali domande o se incontrate difficoltà con gli strumenti Rotor-Gene Q MDx o con i prodotti QIAGEN in generale, non esitate a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale di informazioni relative all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri ricercatori che a quelli di QIAGEN. Pertanto, per suggerimenti sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche, vi esortiamo a contattarci.

Per assistenza tecnica, contattare i servizi tecnici QIAGEN.

Per informazioni aggiornate sul Rotor-Gene Q MDx, visitare <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>.

Sito Web: support.qiagen.com

Quando ci si rivolge ai servizi tecnici QIAGEN relativamente ad errori, tenersi pronti a fornire le seguenti informazioni:

- numero di serie, tipo versione del Rotor-Gene Q MDx
- Codice di errore (se applicabile)
- Momento in cui si è verificato l'errore per la prima volta
- Frequenza della ricorrenza dell'errore (vale a dire, errore intermittente o persistente)
- Copia dei file di registro

1.2.2 Politica aziendale

La politica aziendale di QIAGEN si pone l'obiettivo di migliorare i prodotti di pari passo con la disponibilità di nuove tecnologie e nuovi componenti. QIAGEN si riserva il diritto di modificare le specifiche tecniche in qualsiasi momento. Nel tentativo di produrre una documentazione sempre utile e pertinente, saremo lieti di ricevere i vostri commenti su questo manuale utente. Contattare i servizi tecnici QIAGEN.

1.2.3 Gestione delle versioni

Il presente documento è il Manuale utente del Rotor-Gene Q MDx, revisione R1, per gli strumenti Rotor-Gene Q MDx che utilizzano il software Rotor-Gene Q versione 2.3.x (dove x è ≥ 0).

1.3 Uso previsto del Rotor-Gene Q MDx

Lo strumento Rotor-Gene Q MDx è progettato per operazioni in tempo reale di termociclaggio, individuazione e/o quantificazione mediante reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, 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.

Lo strumento 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.

1.3.1 Requisiti per il Rotor-Gene Q MDx

La tabella riportata di seguito indica il livello generale di competenza e addestramento necessari per il trasporto, l'installazione, l'uso, la manutenzione e l'assistenza del Rotor-Gene Q MDx.

Attività	Personale	Formazione ed esperienza
Consegna	Nessun requisito particolare	Nessun requisito particolare
Installazione	Tecnici di laboratorio o personale equivalente	Personale che abbia ricevuto una formazione adeguata e che abbia familiarità con l'uso del computer e in generale con l'automazione
Uso di routine (esecuzione dei protocolli)	Tecnici di laboratorio o personale equivalente	Utenti professionisti, quali tecnici o medici, esperti delle tecniche di biologia molecolare
Manutenzione di routine	Tecnici di laboratorio o personale equivalente	Utenti professionisti, quali tecnici o medici, esperti delle tecniche di biologia molecolare
Assistenza e manutenzione annuale	Solo specialisti dell'assistenza in loco QIAGEN	Regolarmente addestrati, certificati e autorizzati da QIAGEN

1.4 Materiali richiesti

Nota: utilizzare solo accessori forniti da QIAGEN.

- Rotor-Gene Q MDx 5Plex (n. cat. 9002020)
- Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM (n. cat. 9002030)
- Rotor-Gene Q MDx 6Plex (n. cat. 9002040)
- Laptop (n. cat. 9026760)
- 72-Well Rotor (n. cat. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (n. cat. 9018904)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (n. cat. 9018901)
- Rotor Holder (n. cat. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) (n. cat. 981103)
- Rotor Gene Q SW (n. cat. 9023241)

1.5 Materiali necessari ma non in dotazione


- Occhiali protettivi
- Guanti
- Camice da laboratorio


Per utilizzare il Rotor-Gene Q MDx, è necessario un kit per PCR che però deve essere acquistato separatamente. Per scoprire la gamma dei kit disponibili, controlla [QIAGEN.com](https://www.qiagen.com).

2 Informazioni sulla 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 contenute nel manuale utente devono essere rispettate per garantire il funzionamento sicuro dello strumento e per mantenere lo stesso in condizioni di sicurezza.

Il *Manuale utente del Rotor-Gene Q MDx* contiene i seguenti tipi di informazioni sulla sicurezza.


AVVERTENZA 	Il termine AVVERTENZA segnala situazioni che potrebbero avere come conseguenza lesioni personali per l'utente o terzi. I dettagli di queste circostanze sono segnalati in un riquadro come questo.
--	--

CAUTELE 	Il termine ATTENZIONE segnala situazioni che potrebbero determinare un danno allo strumento o ad altre apparecchiature. I dettagli di queste circostanze sono segnalati in un riquadro come questo.
--	---


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


Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.


2.1 Uso corretto

AVVERTENZA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali 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 dello strumento Rotor-Gene Q MDx deve essere effettuata esclusivamente da uno specialista dell'assistenza in loco QIAGEN.
--	--


Eeguire la manutenzione secondo quanto previsto nella sezione 8. QIAGEN addebiterà i costi delle riparazioni dovute a errata manutenzione.


AVVERTENZA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Il Rotor-Gene Q MDx è troppo pesante per essere sollevato da una persona sola. Per evitare il rischio di lesioni personali o danni allo strumento, non sollevare lo strumento da soli. Per riposizionare lo strumento, contattare i servizi tecnici QIAGEN.
--	---


AVVERTENZA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Non tentare di spostare Rotor-Gene Q MDx mentre è in funzione.
--	---


CAUTELA 	Danni allo strumento 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 sul retro dello strumento ed estrarre il cavo di alimentazione dalla presa di corrente.


CAUTELA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali 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.
---	--

CAUTELA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali 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.
---	--

CAUTELA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Utilizzando lo strumento in modo non specificato dal produttore, potrebbe essere compromessa la protezione offerta dallo strumento stesso.
---	---

CAUTELA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Non lasciare fogli di carta sotto il Rotor-Gene Q MDx perché interferiscono con il suo raffreddamento. Si raccomanda di lasciare perfettamente sgombra l'area sotto lo strumento.
---	--


CAUTELA 	Danni allo strumento 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.
---	---

CAUTELA 	Rischio di danni materiali Ispezionare visivamente il rotore prima di ogni processo e assicurarsi che non sia danneggiato o deformato.
---	--

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.

2.2 Sicurezza elettrica

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

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Pericolo elettrico</p> <p>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.</p> <p>È vietato procurare un'interruzione intenzionale.</p> <p>Tensioni letali all'interno dello strumento</p> <p>Quando lo strumento è connesso alla linea di alimentazione, i morsetti potrebbero essere sotto tensione e l'apertura di coperchi o la rimozione di componenti potrebbero esporre parti collegate all'alimentazione.</p>
--	---


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

- Il cavo di alimentazione deve essere connesso a 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 corrente, quindi contattare i servizi tecnici QIAGEN.

Se la sicurezza elettrica dello strumento è stata compromessa, impedire al resto del personale di usare lo strumento e contattare i servizi tecnici QIAGEN.

La sicurezza elettrica dello strumento potrebbe essere stata compromessa se:

- 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 sottoposto a sollecitazioni gravose durante il trasporto.


AVVERTENZA 	Pericolo elettrico Lo strumento è dotato di un'etichetta di conformità elettrica che indica la tensione e la frequenza dell'alimentazione e i dati dei fusibili. L'apparecchiatura deve essere messa in funzione solo a queste condizioni.
--	--

2.3 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 (<https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>).

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.


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Campioni contenenti agenti infettivi</p> <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'autorità responsabile (ad esempio il direttore del laboratorio) deve adottare tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori dello strumento abbiano ricevuto un addestramento adeguato e non siano esposti a livelli pericolosi di agenti infettivi secondo la definizione delle schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) o dei documenti OSHA,* ACGIH,† o COSHH‡ applicabili.</p> <p>Lo sfianto dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti e le leggi su salute e sicurezza vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Autorità per la salute e la sicurezza nei luoghi di lavoro, Stati Uniti d'America).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferenza governativa americana degli igienisti industriali, Stati Uniti d'America).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Controllo delle sostanze pericolose per la salute, Regno Unito).

2.4 Sicurezza chimica

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Agenti chimici pericolosi</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. L'autorità responsabile (ad esempio, il direttore del laboratorio) deve adottare tutte le precauzioni necessarie per garantire che l'area circostante il luogo di lavoro sia sicura e che gli operatori dello strumento non siano esposti a livelli pericolosi di sostanze tossiche (chimiche o biologiche), come definito nelle schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) o nei documenti OSHA*, ACGIH† o COSHH‡ applicabili.</p> <p>Lo sfianto dei fumi e lo smaltimento dei rifiuti devono avvenire nel rispetto di tutti i regolamenti e le leggi su salute e sicurezza vigenti a livello nazionale, statale e locale.</p>
--	---

* OSHA: Occupational Safety and Health Administration (Autorità per la salute e la sicurezza nei luoghi di lavoro, Stati Uniti d'America).

† ACGIH: American Conference of Government Industrial Hygienists (Conferenza governativa americana degli igienisti industriali, Stati Uniti d'America).

‡ COSHH: Control of Substances Hazardous to Health (Controllo delle sostanze pericolose per la salute, Regno Unito).

Fumi tossici

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


2.5 Smaltimento dei materiali di scarto


Il materiale da laboratorio usato può contenere agenti chimici pericolosi. Tali materiali di scarto devono essere raccolti ed eliminati correttamente secondo le norme di sicurezza locali.


Per ulteriori informazioni sulle modalità di smaltimento del Rotor-Gene Q MDx, vedere "Direttiva sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE)", a pagina 201.


2.6 Pericoli meccanici


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


AVVERTENZA 	Parti in movimento 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 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Aprire e chiudere con cautela il coperchio del Rotor-Gene Q MDx per evitare che le dita o gli abiti vi restino intrappolati.
--	---


AVVERTENZA 	Danni allo strumento 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 i servizi tecnici QIAGEN.
--	---


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Danni allo strumento</p> <p>Avviando il Rotor-Gene Q MDx immediatamente dopo la consegna in un clima freddo, le parti meccaniche potrebbero bloccarsi.</p> <p>Attendere almeno un'ora affinché lo strumento arrivi a temperatura ambiente prima di accenderlo.</p>
--	--

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Danni allo strumento</p> <p>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>
--	---

<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Rischio di surriscaldamento</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>
--	--


Pericolo termico


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Superficie bollente</p> <p>La camera del Rotor-Gene Q MDx può raggiungere temperature superiori a 120°C. Evitare di toccarlo quando è rovente.</p>
--	--


<p>AVVERTENZA</p> 	<p>Superficie bollente</p> <p>Quando si mette in pausa un processo, il Rotor-Gene Q MDx non si raffredda completamente fino alla temperatura ambiente. Usare cautela prima di maneggiare il rotore o le provette nello strumento.</p>
--	--


2.7 Sicurezza durante la manutenzione

Eeguire la manutenzione secondo quanto previsto nella sezione 8. QIAGEN addebiterà i costi delle riparazioni dovute a errata manutenzione.

AVVERTENZA/ CAUTELA 	Rischio di lesioni personali e danni materiali Eeguire solo la manutenzione richiesta esplicitamente nel presente manuale.
---	--











AVVERTENZA 	Rischio di incendio Se si pulisce il Rotor-Gene Q MDx con disinfettante a base di alcol, lasciare aperto lo sportello del Rotor-Gene Q MDx per permettere la dispersione dei vapori infiammabili.
--	---

AVVERTENZA/ CAUTELA 	Pericolo di folgorazione Non smontare il Rotor-Gene Q MDx.
---	--

CAUTELA 	Danni alla carcassa dello strumento 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.
---	---

2.8 Simboli sul Rotor-Gene Q MDx

I seguenti simboli potrebbero comparire nel manuale utente o su confezioni ed etichette:

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-diagnostico in vitro
	Targhetta identificativa sul retro dello strumento	Marchio CSA per il Canada e gli USA
	Targhetta identificativa sul pannello laterale destro	Produttore legale.
	Targhetta identificativa sul pannello laterale destro	RAEE sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici per l'Europa e il resto del mondo.
	Targhetta identificativa sul pannello laterale destro	Marchio FCC della Federal Communications Commission degli Stati Uniti
	Targhetta identificativa sul pannello laterale destro	Marchio RCM (in precedenza C-Tick) per l'Australia (identificazione fornitore N17965)
	Targhetta identificativa sul pannello laterale destro	Marchio RoHS per la Cina (restrizioni all'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche)

3 Descrizione generale

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

3.1 Principio del Rotor-Gene Q MDx

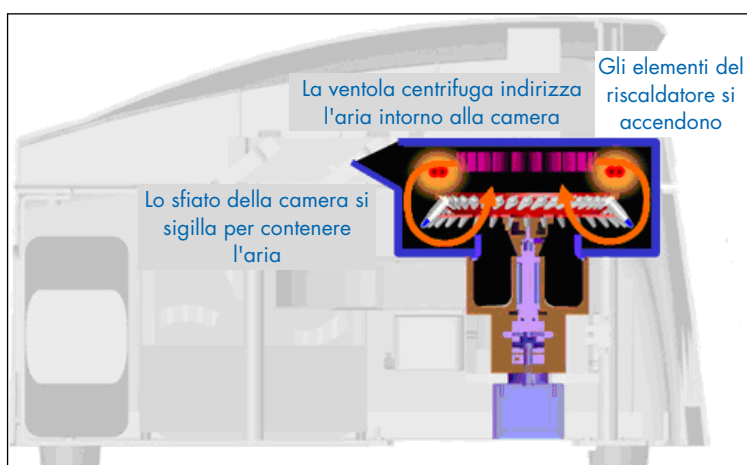
3.1.1 Performance termica

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

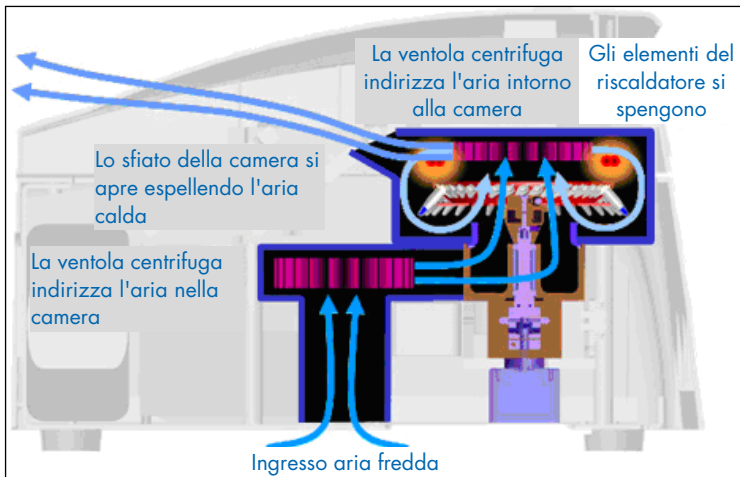


Illustrazione del sistema di riscaldamento e raffreddamento

3.1.2 Sistema ottico

Con una scelta di 6 fonti di eccitazione e 6 filtri di sensibilità 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 calibrazione o compensazione.

I campioni sono eccitati dal fondo della camera mediante 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, per cui non occorre usare un colorante interno passivo di riferimento quale il ROX™.

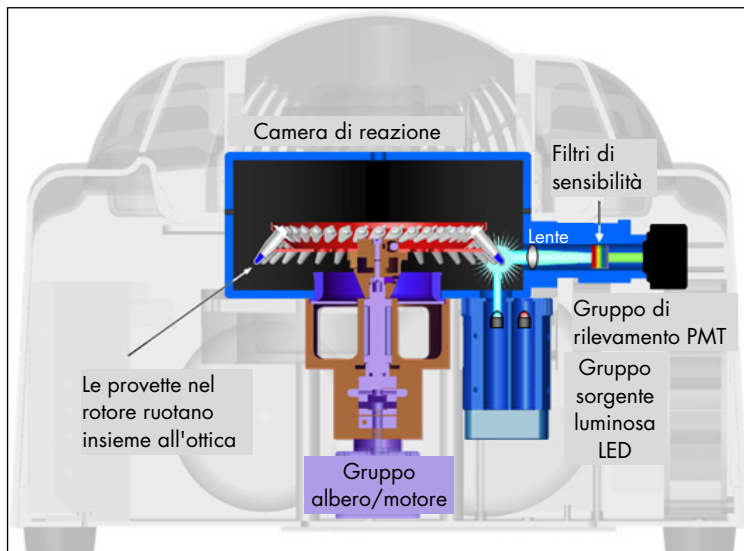


Illustrazione del sistema ottico

3.1.3 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 passa-alto	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Analisi di fusione ad alta risoluzione (High resolution melt, 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 determinate combinazioni di coloranti. Per maggiori informazioni, consultare i manuali dei kit corrispondenti.

3.2 Funzioni esterne del Rotor-Gene Q MDx



- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1 Sfiati per l'aria sul coperchio | 3 Camera rotore |
| 2 Manico del coperchio | 4 Spie di stato dello strumento |

3.2.1 Sfiati per l'aria sul coperchio

Il Rotor-Gene Q dispone di sfiati nella parte posteriore del coperchio dello strumento. Tali sfiati consentono allo strumento la fuoriuscita del calore dalla camera durante il funzionamento. Il blocco degli sfiati o una distanza insufficiente intorno a essi può compromettere le prestazioni dello strumento.

3.2.2 Manico del coperchio

Il manico del coperchio viene utilizzato per far scorrere indietro il coperchio dello strumento. Questo manico non è ideato per supportare il peso dello strumento e non deve essere utilizzato per sollevare lo strumento.

3.2.3 Camera rotore

La camera rotore è il punto in cui i rotori vengono caricati e sottoposti ai passaggi di riscaldamento e ciclaggio.

3.2.4 Spie di stato dello strumento

Sul Rotor-Gene Q sono presenti due spie di stato. La spia di standby indica che lo strumento non è in uso. La spia di funzionamento lampeggia quando il Rotor-Gene Q è in uso.

3.3 Funzioni interne del Rotor-Gene Q MDx



Vista interna della camera del Rotor-Gene Q

- 1 Mozzo del rotore 2 Lente ottica

3.3.1 Mozzo del rotore

Il mozzo del rotore tiene il rotore in posizione all'interno dello strumento.

3.3.2 Lente ottica

Lente ottica sulla quale è centrato il diodo luminoso di eccitazione sulle provette.

4 Procedure di installazione

4.1 Consegna e installazione del sistema

All'installazione dovrebbe assistere una persona che sia a conoscenza del laboratorio e dell'attrezzatura informatica.

Vengono consegnati i seguenti articoli:

- Strumento Rotor-Gene Q MDx
- *Manuale utente del Rotor-Gene Q MDx*
- Stazione di lavoro
- Software del Rotor-Gene Q MDx (sarà installato dall'assistenza in loco QIAGEN durante l'installazione iniziale)

4.1.1 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 su supporti rimovibili con i manuali)
- Supporti rimovibili (software)
- Supporti rimovibili (manuali)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (smontato per sicurezza durante il trasporto)
- 36-Well Rotor (questo rotore è di colore rosso)
- 36-Well Rotor Locking Ring

I seguenti articoli sono imballati su ciascun lato dell'imballo in espanso:

- Cavo seriale USB e RS-232
- Set di cavi di alimentazione internazionali
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 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:

- 72-Well Rotor (questo rotore è di colore blu)
- 72-Well Rotor Locking Ring

La confezione può includere anche un computer portatile, a seconda dell'ordine effettuato.

4.1.2 Installazione dell'hardware

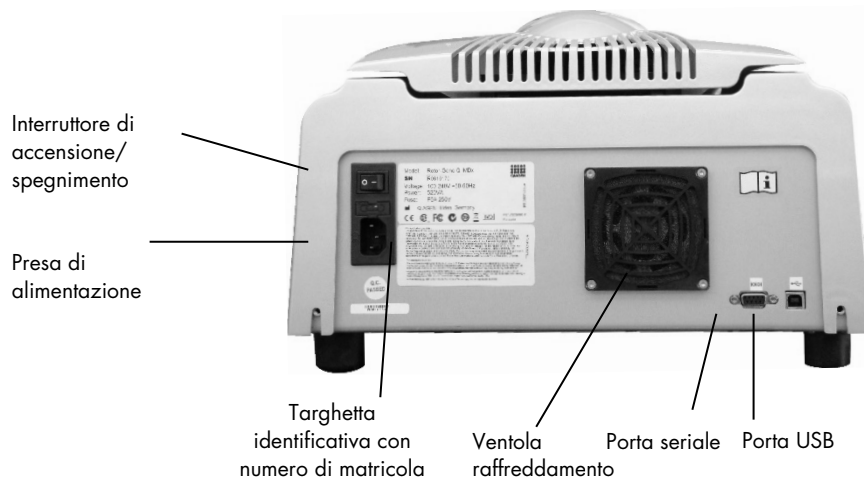
Una volta disimballato il Rotor-Gene Q MDx, procedere con l'installazione come descritto di seguito.

<p>CAUTELA</p> 	<p>Danni allo strumento</p> <p>Se il Rotor-Gene Q MDx viene avviato immediatamente dopo la consegna in un clima freddo, le parti meccaniche potrebbero bloccarsi. Attendere almeno un'ora affinché lo strumento arrivi a temperatura ambiente prima di accenderlo.</p>
---	---

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 corrente CA.

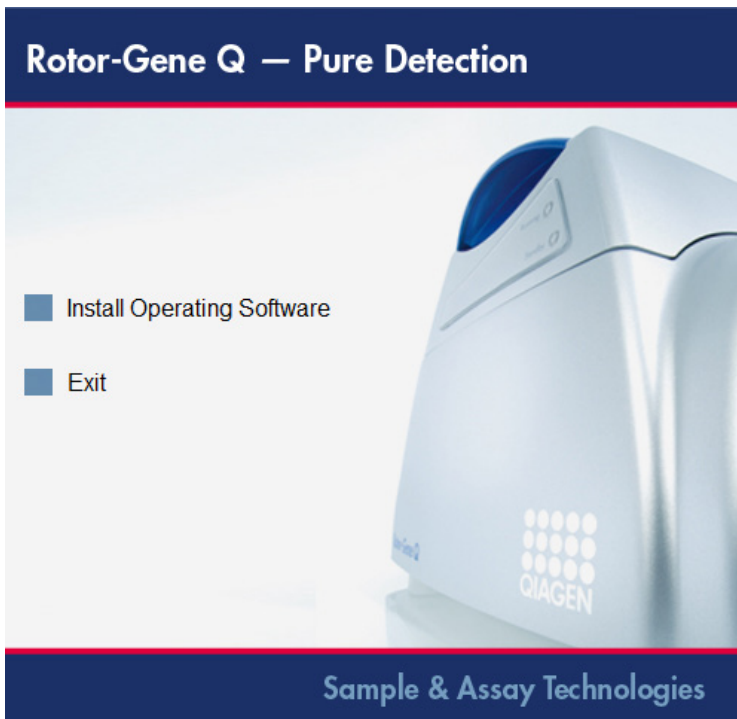


Nota: collegare il Rotor-Gene Q MDx al computer esclusivamente con i cavi USB e seriali forniti in dotazione con lo strumento. Non usare altri cavi.

4.1.3 Installazione del software

1. Per installare il software Rotor-Gene Q, scaricare il software da QIAGEN.com e trasferirlo al computer su un supporto rimovibile privo di virus o inserire nel computer i supporti rimovibili (software) inviati con lo strumento.
2. Se l'installazione software parte automaticamente, selezionare Install Operating Software (Installare software operativo) nella finestra che si apre o passare alla cartella software RGQ sul supporto rimovibile.

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 che il software è stato installato, verrà creato automaticamente un'icona sul desktop.
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 inizia la connessione a un computer per la prima volta, il Rotor-Gene Q MDx verrà riconosciuto dal sistema operativo e verranno visualizzati molti messaggi. Per le istruzioni, fare riferimento alla *Guida per l'installazione di Rotor-Gene Q* fornita con lo strumento (supporti rimovibili ed edizione stampata).



5. Fare doppio clic sull'icona Rotor-Gene Q Series (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.

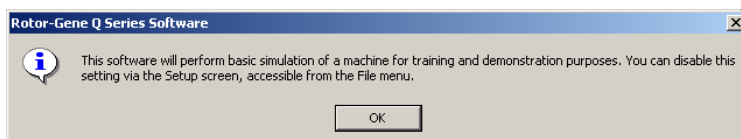
Port (Porta): scegliere tra cavo USB o seriale. Selezionare la porta di comunicazione appropriata o fare clic sul pulsante Auto-Detect (Rilevamento automatico).

Auto-Detect (Rilevamento automatico) Se si utilizza questa opzione, la corrispondente porta USB o seriale sarà individuata automaticamente e visualizzata nell'elenco a discesa Port (Porta).

Run in Virtual Mode (for demonstration) (Processo in modo virtuale (a scopo dimostrativo)): Selezionando questa casella si consente l'installazione del software Rotor-Gene 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, è necessario apportare la modifica nella finestra Setup (vedere la sezione 6.5.4).

Begin (Inizio): una volta immesse tutte le informazioni, fare clic su Begin (Inizio). Attendere la fine dell'inizializzazione. L'operazione può durare qualche secondo. Se è stato scelto il modo virtuale, comparirà il seguente messaggio:

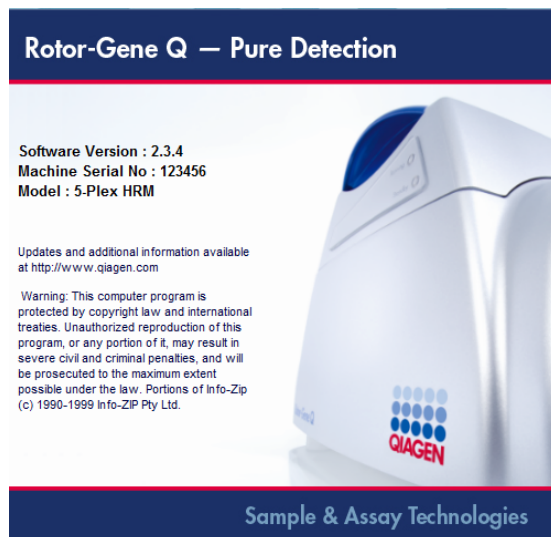


Se non è stata selezionata la casella Run in Virtual Mode (Processo in modo virtuale), il software viene inizializzato e si apre automaticamente.

Exit Program (Uscita dal programma): Fare clic su questo pulsante per uscire dal programma.

4.1.4 Versione software

Per trovare il numero della versione installata, fare clic Help (Aiuto) 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.

4.1.5 Software aggiuntivo sui computer connessi agli strumenti Rotor-Gene Q MDx

Il software Rotor-Gene Q gestisce processi critici dal punto di vista temporale durante il processo di PCR e quello di acquisizione dei dati. Per questo motivo, è importante assicurarsi che nessun altro processo utilizzi risorse del sistema significative, rallentando il software Rotor-Gene Q. È particolarmente importante prestare attenzione ai punti elencati di seguito.

Si raccomanda agli amministratori di sistema di valutare gli effetti che una modifica del sistema può avere sulle sue risorse prima di implementarla.

Software antivirus

QIAGEN è consapevole della minaccia rappresentata dai virus per ogni computer che scambi dati con altri computer. È previsto che il software Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 o 2.1 venga

installato principalmente in ambienti in cui sono implementate le politiche locali atte a minimizzare tale minaccia. Tuttavia, QIAGEN consiglia in ogni caso l'utilizzo di un programma software antivirus.

La scelta e l'installazione di uno strumento antivirus appropriato ricade sotto la responsabilità del cliente. Tuttavia, QIAGEN ha verificato che il software Rotor-Gene Q mostra compatibilità con il laptop QIAGEN in combinazione con i due seguenti software antivirus:

- Microsoft Defender versione client 4.18.2005.5

Per le versioni più recenti del software antivirus verificate in combinazione con il software Rotor-Gene Q e Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 o 2.1, fare riferimento a QIAGEN.com.

Se si sceglie un software antivirus, assicurarsi che possa essere configurato in modo tale che il percorso alla cartella del database possa essere escluso dalla scansione. Altrimenti, sussiste il rischio di errori di connessione al database. Poiché il software Rotor-Gene AssayManager versioni 1.0 e 2.1 crea in maniera dinamica nuovi archivi del database, è necessario escludere il percorso della cartella ai file e a file non singoli. Non si consiglia l'utilizzo di software antivirus in cui possono essere esclusi solo singoli file, ad esempio, McAfee Antivirus Plus V16.0.5. Inoltre, se il computer è utilizzato in un ambiente senza l'accesso alla rete, assicurarsi che il software antivirus supporti gli aggiornamenti offline.

Per ottenere risultati idonei dopo l'installazione di un software antivirus, è necessario che gli amministratori di sistema garantiscano quanto segue:

- come spiegato in precedenza, il percorso della cartella di database del Rotor-Gene AssayManager 1.0 e 2.1 (C:\Program Files\Microsoft SQL Server\MSSQL10_50.RGAMINSTANCE\MSSQL\DATA) deve essere escluso dalle scansioni file.
- Gli aggiornamenti al database dei virus non vengano eseguiti quando Rotor-Gene AssayManager 1.0 o 2.1 è in uso.
- Assicurarsi che siano disabilitate le scansioni totali o parziali del disco rigido durante l'acquisizione di dati real-time PCR. In caso contrario, esiste il rischio di effetti negativi sulle prestazioni dello strumento.

Per maggiori dettagli sulla configurazione, leggere il manuale del software antivirus selezionato.

Firewall e reti

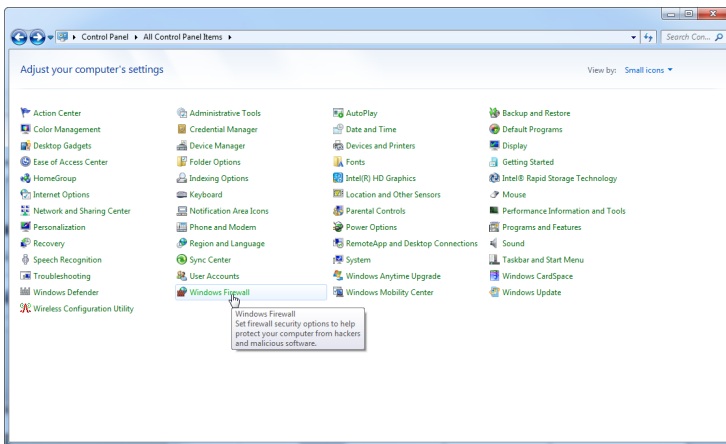
Il software Rotor-Gene Q può essere eseguito sia su computer senza accesso alla rete che in un ambiente di rete, se si utilizza un server di database remoto. Per il funzionamento con la rete, il

firewall sul laptop fornito da QIAGEN è configurato in modo che il traffico in entrata venga bloccato per tutte le porte, fatta eccezione per quelle che richiedono di stabilire una connessione alla rete.

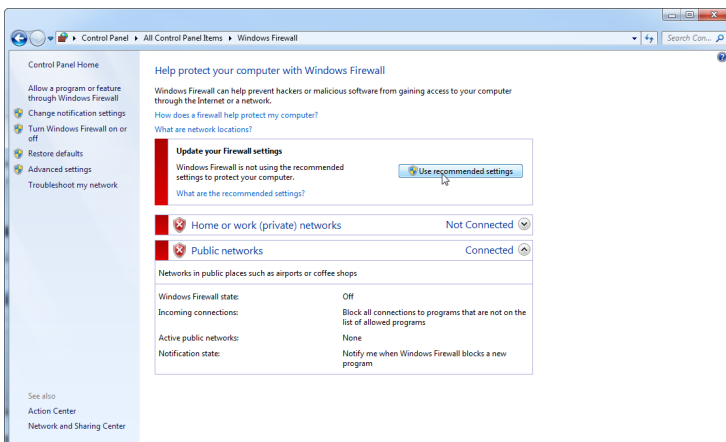
Si sottolinea che il blocco delle connessioni in entrata non influisce sulle risposte alle richieste attivate dall'utente. Le connessioni in uscita sono consentite in quanto potrebbero essere necessarie per il recupero degli aggiornamenti.

Se la configurazione in uso è diversa, QIAGEN consiglia di configurare il firewall nello stesso modo appena descritto. A tal fine, è necessario che un amministratore di sistema esegua il login ed effettui la seguente procedura:

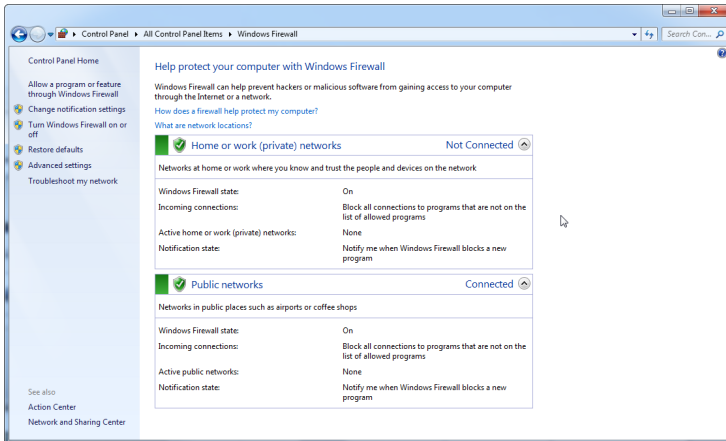
1. Aprire il Control Panel (Pannello di controllo) e selezionare Windows Firewall.



2. Selezionare Use recommended settings (Usa impostazioni consigliate).

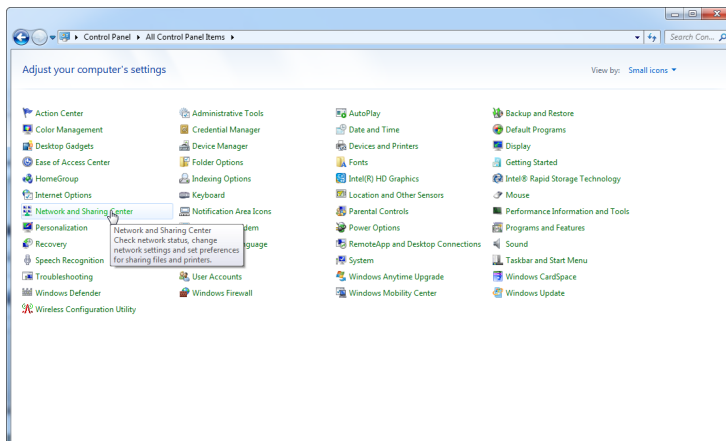


3. Controllare che le seguenti impostazioni siano attive:

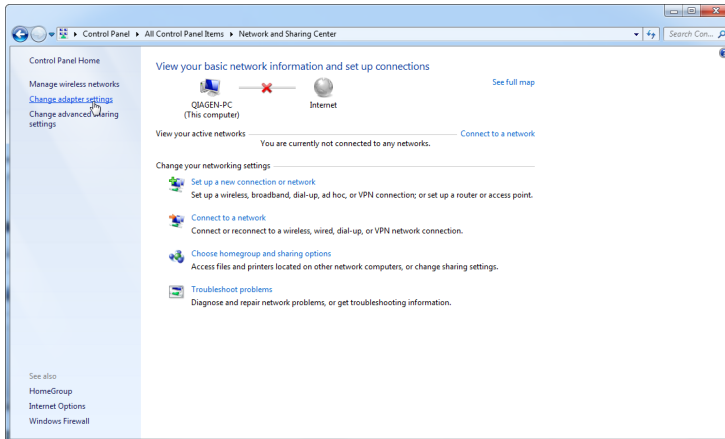


Per motivi di sicurezza e affidabilità, deve essere utilizzato un accesso alla rete via cavo invece di uno Wi-Fi. I laptop forniti da QIAGEN hanno una scheda Wi-Fi disabilitata. Se la configurazione in uso è diversa, è necessario che un amministratore di sistema disabiliti manualmente la scheda Wi-Fi. Ciò può essere fatto attraverso la seguente procedura:

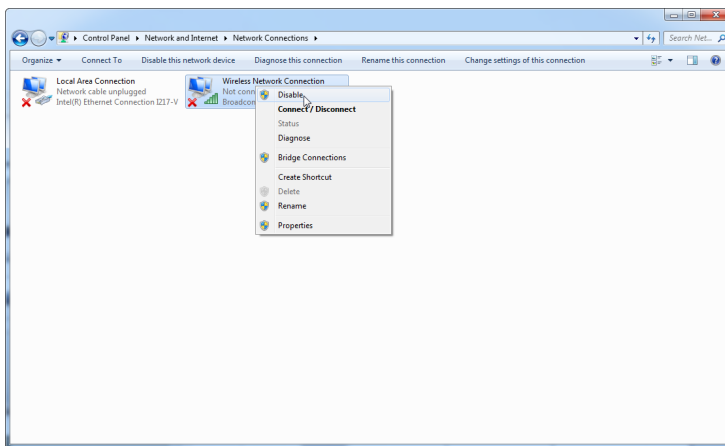
1. Aprire il Control Panel (Pannello di controllo) e selezionare Network and Sharing Center (Centro connessioni di rete e condivisione).



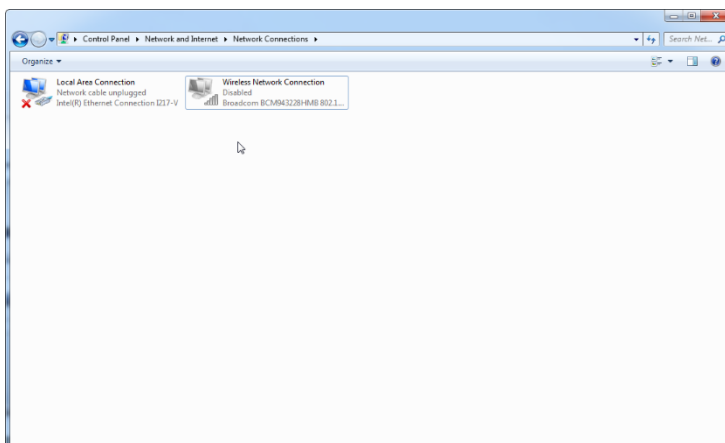
2. Selezionare Change adapter settings (Modifica impostazioni scheda).



3. Posizionarsi su Wireless Network Connection (Connessione rete wireless), premere il pulsante destro del mouse, quindi selezionare Disable (Disattiva) dal menu contestuale.



4. Controllare che la connessione rete wireless sia disattivata.



Strumenti di sistema

Molti strumenti di sistema possono utilizzare in modo significativo le risorse del sistema anche senza alcuna interazione da parte dell'utente. Esempi tipici di questo tipo di strumenti sono:

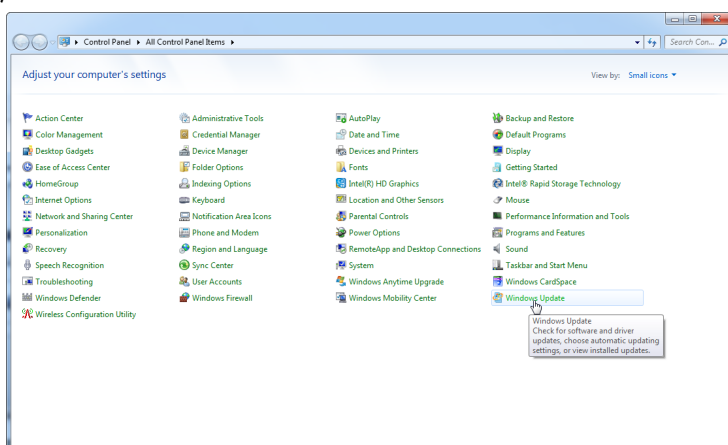
- "File indexing" (indicizzazione file), che è eseguito come attività in background da molte attuali applicazioni per ufficio;
- Deframmentazione del disco, che spesso inoltre impiega un'attività in background
- Qualsiasi software che verifica la presenza di aggiornamenti in Internet
- Strumenti di monitoraggio e gestione in remoto

Tenere presente che a causa della natura dinamica del mondo IT, questo elenco può non essere completo e che possono essere rilasciati strumenti non noti al momento della scrittura. È importante che gli amministratori di sistema prestino attenzione a che uno strumento di questo tipo non sia attivo durante l'esecuzione di una PCR.

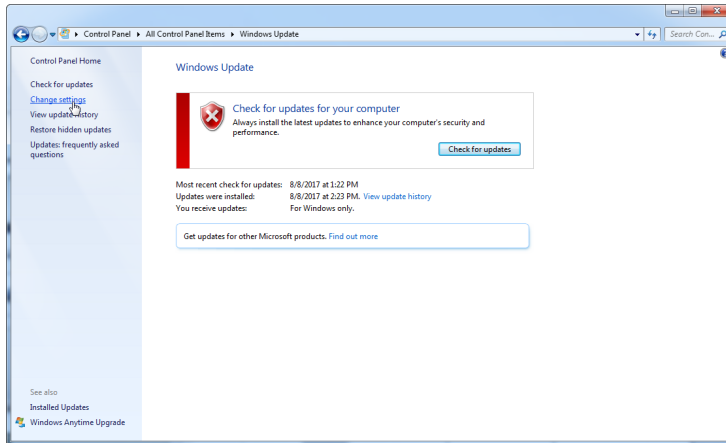
Aggiornamenti del sistema operativo

I laptop forniti da QIAGEN sono configurati in modo che gli aggiornamenti automatici del sistema operativo siano disabilitati. Se la configurazione in uso è diversa, è necessario che un amministratore di sistema disabiliti qualsiasi processo di aggiornamento automatico del sistema operativo attraverso la seguente procedura:

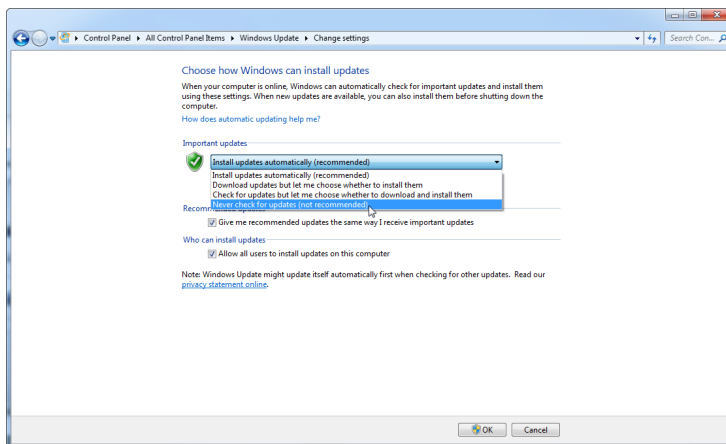
1. Aprire il Control Panel (Pannello di controllo) e selezionare Windows Update (Aggiornamenti di Windows).



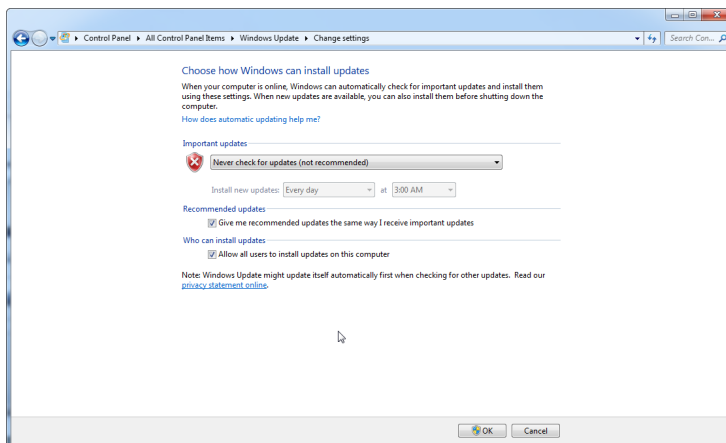
2. Selezionare Change settings (Modifica impostazioni).



3. Selezionare Never check for updates (Non verificare mai disponibilità aggiornamenti).



4. Controllare che sia attiva l'opzione Important updates (Aggiornamenti importanti) Never check for updates (Non verificare mai disponibilità aggiornamenti).



Nel caso in cui gli aggiornamenti risultino necessari a causa di vulnerabilità scoperte del sistema, QIAGEN offre dei meccanismi per installare uno specifico set di patch di sicurezza Windows convalidate in modalità online (se è disponibile una connessione Internet sul computer portatile QIAGEN) o come pacchetto offline, preparato su un computer separato con connessione Internet.

Per ulteriori informazioni, consultare la pagina del prodotto su QIAGEN.com


4.2 Requisiti del sito


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 che il banco di lavoro deve possedere, contattare i servizi tecnici QIAGEN.

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

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

AVVERTENZA 	Atmosfera esplosiva Lo strumento Rotor-Gene Q MDx non è destinato all'uso in atmosfera esplosiva.
--	---

AVVERTENZA 	Rischio di surriscaldamento Per garantire la ventilazione corretta, mantenere una distanza minima di 10 cm sul retro dello strumento Rotor-Gene Q MDx. Le fessure e le aperture che garantiscono la ventilazione dello strumento Rotor-Gene Q MDx non devono essere coperte.
--	---

4.3 Collegamento all'alimentazione CA

4.3.1 Requisiti di alimentazione

Il Rotor-Gene Q MDx funziona a:

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

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

4.3.2 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 CA a 3 conduttori che, se collegato a una presa CA adeguata, collega a terra lo strumento. Per tutelare questa funzione di protezione, non collegare lo strumento a prese di alimentazione CA che non siano dotate di messa a terra (collegamento a massa).

4.3.3 Installazione del cavo di alimentazione CA

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

4.4 Configurazione per la sicurezza in Windows

I laptop forniti da QIAGEN per l'utilizzo con lo strumento Rotor-Gene Q MDx sono dotati di Microsoft Windows 7 o Windows 10 e sono configurati con un account utente di Windows di tipo standard (senza diritti di amministratore) e un account amministratore. Nell'uso di routine del sistema, è necessario utilizzare l'account standard poiché il software Rotor-Gene Q e Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 o 2.1 sono progettati per l'esecuzione senza i diritti di amministratore. L'account amministratore, quello con lo sfondo rosso del desktop, dovrà essere utilizzato solo per installare il software Rotor-Gene Q o Rotor-Gene AssayManager versione 1.0 o 2.1 e un Software aggiuntivo sui computer connessi agli strumenti Rotor-Gene Q MDx (vedere la sezione "Software antivirus"). L'utilizzo dell'account amministratore è indicato da uno sfondo rosso del desktop. Assicurarsi di eseguire sempre il login come utente standard per l'utilizzo di routine.

Q1a#g3n!A6 è la password predefinita dell'account amministratore. Modificare dopo il primo login la password dell'amministratore. Assicurarsi che la password sia sicura e non venga persa. Non è presente alcuna password per l'account operatore.

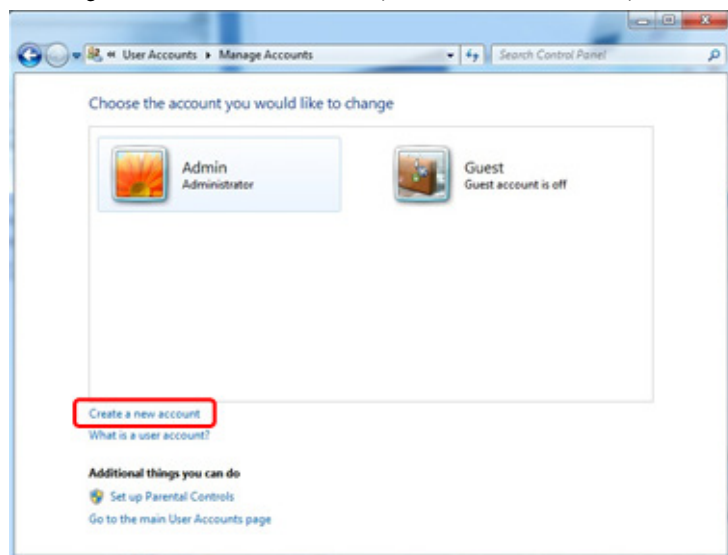
Se la password amministratore del laptop viene persa, contattare Microsoft per ricevere assistenza.

Se la configurazione in uso è diversa e non è disponibile alcun account senza diritti di amministratore, è necessario che un amministratore di sistema configuri un altro account utente di Windows di tipo standard, in modo da evitare l'accesso alle aree critiche del sistema, come Program Files (Programmi) e la cartella Windows (ad esempio, l'accesso per l'installazione o la disinstallazione di funzionalità, incluse le applicazioni, i componenti del sistema operativo, le impostazioni di data/ora, gli aggiornamenti di Windows, i firewall, i diritti e ruoli degli utenti e l'attivazione di programmi antivirus) o alle impostazioni relative alle prestazioni come il risparmio di energia.

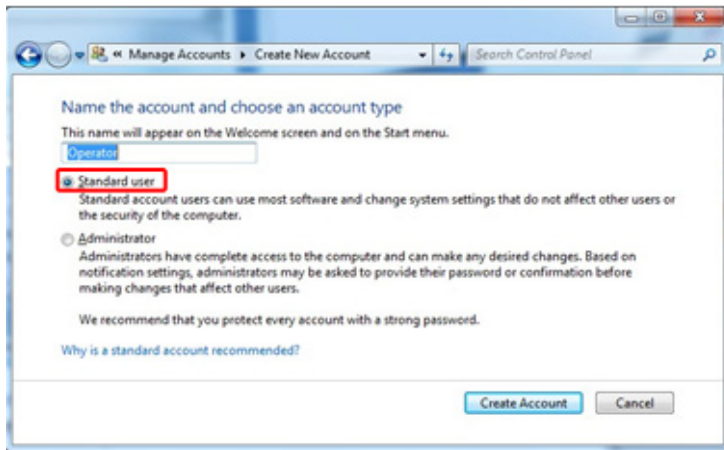
Per creare un account utente standard in Windows 7, seguire il procedimento descritto nella sezione "Creazione di un nuovo account utente":

Aprire il Control Panel (Pannello di controllo) di Windows tramite il menu Start e selezionare User Accounts (Account utente) > Manage Accounts (Gestisci account).

1. Scegliere Create a new account (Crea un nuovo account).



2. Assegnare un nome all'account e selezionare Standard user (Utente standard) come tipo di account.



3. Fare clic su Create Account (Crea account).

4.5 Requisiti relativi alla stazione di lavoro

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

Requisiti di sistema della stazione di lavoro

Descrizione	Requisiti minimi
Sistema operativo	Microsoft® Windows® 10 Professional edition (64 bit); Microsoft Windows 7 Professional edition (32 bit o 64 bit)* (Service Pack 1)
Processore	Intel® Core™ 2 Duo 1,66 GHz o superiore
Memoria principale	Minimo 1 GB di RAM
Spazio su disco fisso	Minimo 10 GB di HDD
Grafica	Adattatore e schermo da almeno 1200 x 800 pixel
Porte	Porta seriale RS-232 o porta USB
Dispositivo di puntamento	Touchpad o mouse o dispositivo equivalente, se necessario
Bluetooth	Deve essere disattivato
Visualizzatore PDF o simile	Deve essere installato; non è incluso nei pacchetti di installazione del software
Opzioni di alimentazione	Non disattivare mai i dischi rigidi la funzione di ibernazione né passare in stand-by

* Per eseguire il software Rotor-Gene Q con le funzionalità di sicurezza, è necessario Microsoft Windows 10 o Windows 7 Professional (vedere la sezione 6.9). Le funzionalità di sicurezza non sono disponibili se si utilizza la Home Edition di Windows 10 o di Windows 7.

† Quando si utilizza il software Rotor-Gene AssayManager® versione 1.0 o 2.1, i requisiti del PC indicati di seguito sono diversi: Processore Intel Core i3-380M, memoria principale da 4 GB di RAM, spazio su disco rigido di 250 GB, porta USB richiesta.

4.6 Disimballaggio installazione 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 su supporti rimovibili con i manuali)
- Supporti rimovibili (software)
- Supporti rimovibili (manuali)
- Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes
- Rotor Holder (smontato per sicurezza durante il trasporto)
- 36-Well Rotor (questo rotore è di colore rosso)
- 36-Well Rotor Locking Ring

I seguenti articoli sono imballati su ciascun lato dell'imballo in espanso:

- Cavo seriale USB e RS-232
- Set di cavi di alimentazione internazionali
- PCR Tubes, 0.2 ml (1000)
- Strip Tubes and Caps, 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:

- 72-Well Rotor (questo rotore è di colore blu)
- 72-Well Rotor Locking Ring

La confezione può includere anche un computer portatile, a seconda dell'ordine effettuato.

4.6.1 Aggiornamento software

Gli aggiornamenti del software sono disponibili sul sito QIAGEN all'indirizzo <https://www.qiagen.com/products/instruments-and-automation/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/>, a cui si può accedere dal menu Help (Aiuto) del software. Per scaricare il software, è necessario registrarsi online.

4.7 Accessori

I Rotor-Disc e gli accessori possono essere ordinati separatamente per l'uso su Rotor-Gene Q MDx. Per ulteriori informazioni, vedere la sezione 16.

4.8 Riconfezionamento e spedizione del Rotor-Gene Q MDx

Per il riconfezionamento del Rotor-Gene Q MDx per la spedizione, è necessario utilizzare i materiali di imballaggio originali. Se i materiali di imballaggio originali non sono applicabili, contattare i servizi tecnici QIAGEN. Assicurarsi che lo strumento sia stato preparato correttamente (vedere Manutenzione) prima dell'imballaggio e che non presenti alcun pericolo biologico o chimico.


4.9 Guida introduttiva


4.9.1 Accensione del Rotor-Gene Q MDx e della stazione di lavoro.

Accertarsi che il Rotor-Gene Q sia connesso al computer portatile tramite USB o RS-232 e che sia il computer portatile che Rotor-Gene Q siano collegati e alimentati.

5 Procedure di funzionamento

Prima di procedere, si raccomanda di acquisire familiarità con le funzioni dello strumento consultando la sezione 3.

CAUTELA 	Danni allo strumento Utilizzare solo celle di flusso e materiali di consumo QIAGEN con il Rotor-Gene Q MDx. I danni causati dall'uso di altri tipi di celle di flusso o materiali di consumo annullano la garanzia.
---	---

CAUTELA 	Rischio di danni materiali Evitare di muovere il banco di lavoro e di causare vibrazioni al Rotor-Gene Q MDx durante il funzionamento per evitare di disturbare le misurazioni ottiche sensibili.
---	---

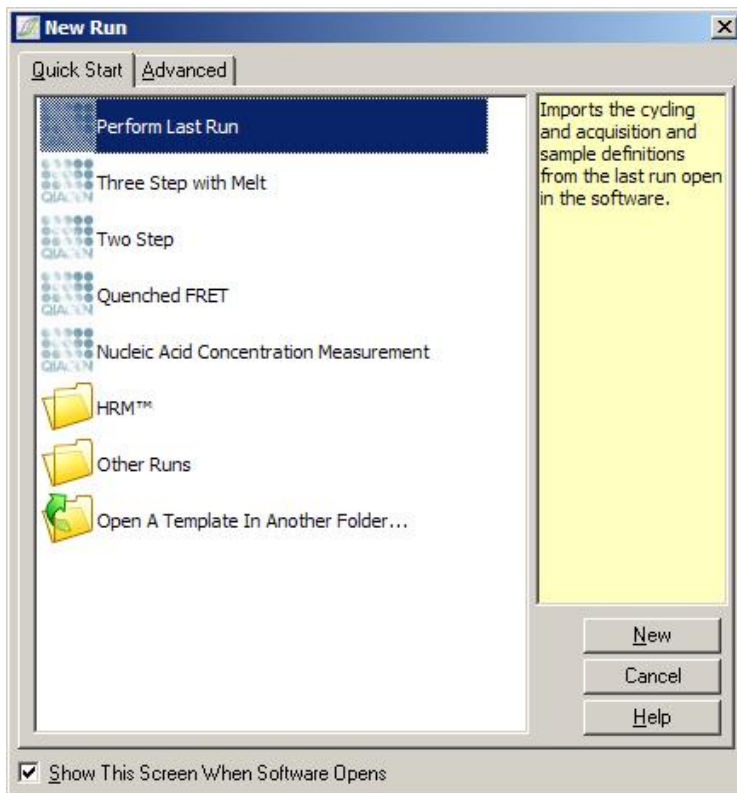
5.1 Uso del software Rotor-Gene Q MDx

Si possono preparare nuovi processi con le procedure guidate Quick Start (Avvio Rapido) o Advanced (Avanzata), visualizzate quando si avvia il software. La procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido) è stata pensata per consentire all'utente di avviare il processo il più rapidamente possibile. La procedura guidata Advanced (Avanzata) consente più opzioni, quali la configurazione di Ottimizzazione gain e le impostazioni di volume. Per comodità, le procedure guidate hanno diversi modelli 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).

5.1.1 Procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido)

La procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido) 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 (Avvio Rapido) ipotizza un volume di reazione di 25 µl. Per altri volumi di reazione, utilizzare la procedura guidata Advanced (Avanzata) (vedere la sezione 5.1.2).

Come primo passo, selezionare il modello desiderato per il processo facendo due volte clic sul modello nella lista della finestra New Run (Nuovo processo).



Perform Last Run (Esegui ultimo processo):	Perform Last Run (Esegui ultimo processo) usa le definizioni di ciclo, 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 di 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 (FRET con colorante quencher):	questo è un profilo di ciclo a tre fasi e una curva di fusione. Diversamente da Tre fasi con fusione, l'acquisizione è alla fine della fase di annealing.
Nucleic Acid Concentration Measurement (Misurazione concentrazione acidi nucleici):	questo è un modello predefinito 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.

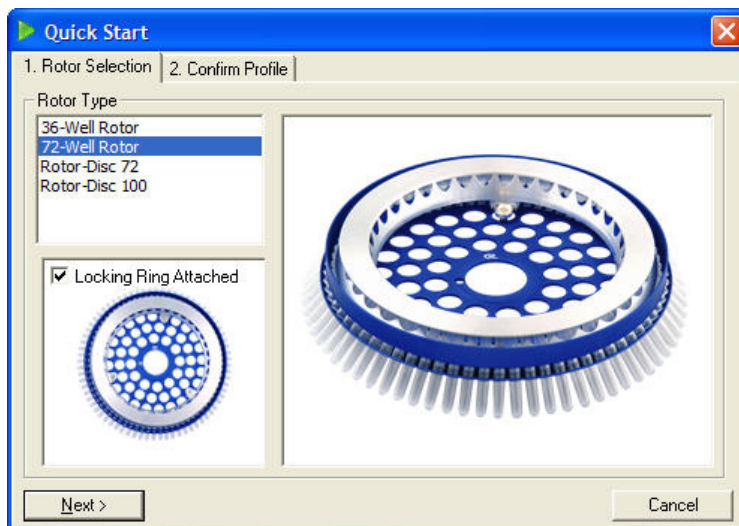
Nota: i modelli definiti dall'utente possono essere aggiunti alla lista dei modelli nella procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido) copiando o salvando i file *.ret in C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\Quick Start Templates. Dopo aver copiato un file in questo percorso, il modello comparirà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

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

Selezione del rotore

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

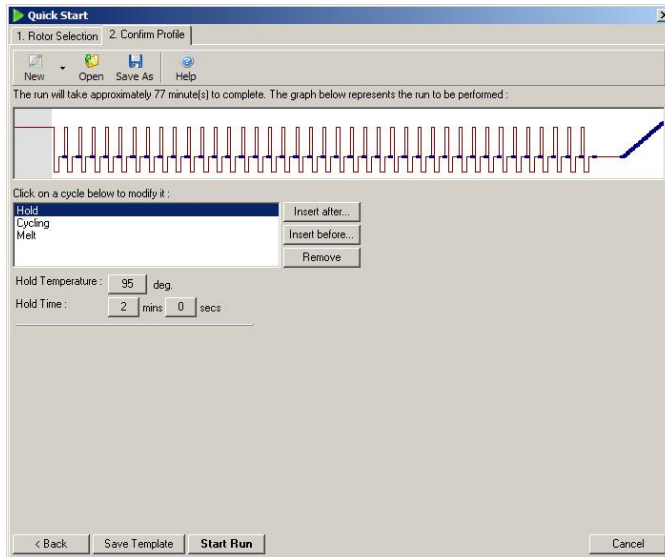
Selezionare la casella Locking Ring Attached (Anello di bloccaggio applicato) e fare clic su Next (Avanti).



Conferma del profilo

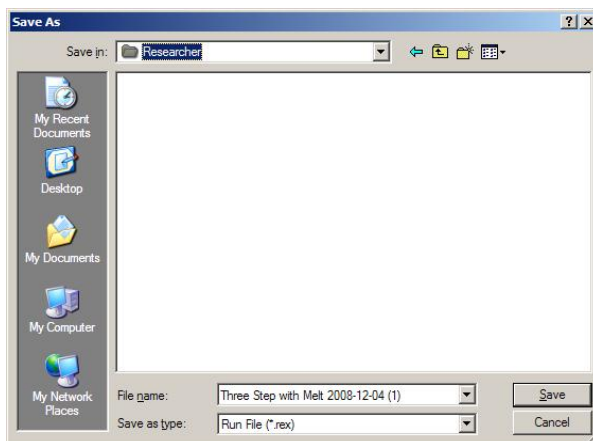
Le condizioni di ciclo e i canali di acquisizione del modello scelto vengono importati. È possibile apportare modifiche utilizzando la finestra Edit Profile (Modifica profilo) (vedere la sezione "Edit Profile (Modifica profilo)").

Per avviare un processo, fare clic sul pulsante Start Run (Avvia processo). È anche possibile salvare il modello prima di iniziare il processo facendo clic su Save Template (Salva modello).



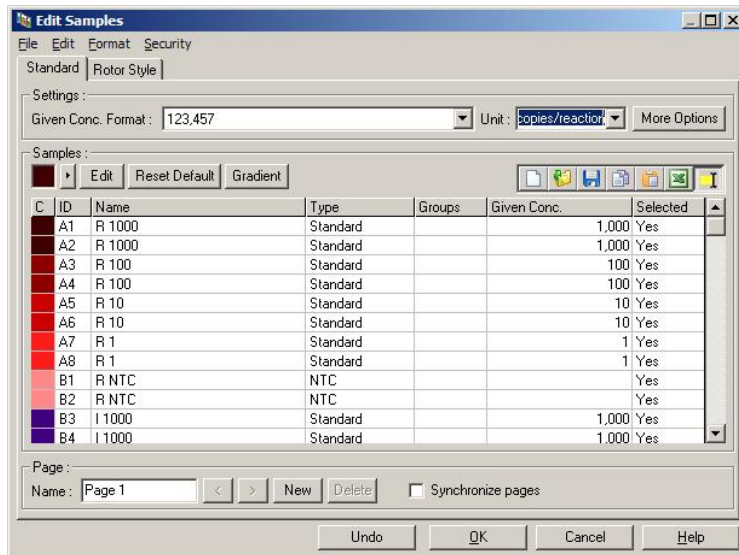
Salvataggio del processo

Dopo aver fatto clic sul pulsante Start Run (Avvia processo), viene visualizzata la finestra Save As (Salva con nome). Il processo può essere salvato nel percorso 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 processi eseguiti con lo stesso modello nella stessa data.



Preparazione del campione

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

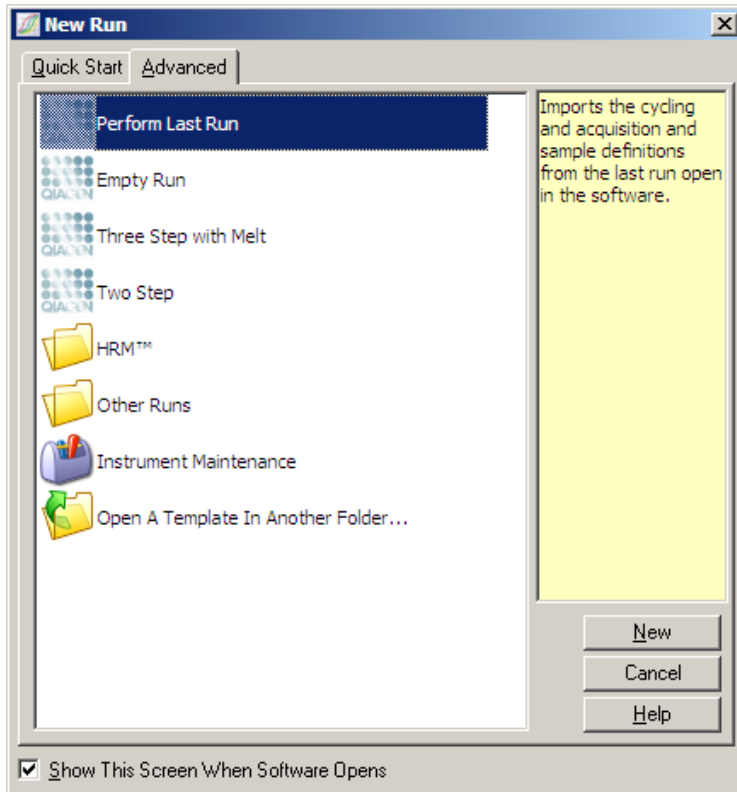


La finestra Edit Samples (Modifica campioni) si apre dopo che il processo è stato avviato, in modo che l'utente possa utilizzare questo tempo per immettere i nomi dei campioni. Se i nomi dei campioni vengono immessi molto rapidamente durante il processo (ad esempio, utilizzando uno scanner per codici a barre) è possibile che le lettere al loro interno vengano invertite. Pertanto, è consigliabile evitare di utilizzare uno scanner per codici a barre e, se applicabile, immettere i nomi dei campioni una volta completato il processo. Per informazioni sulla configurazione delle definizioni dei campioni nella finestra Edit Samples (Modifica campioni), vedere la sezione 6.8.4.

5.1.2 Procedura guidata Advanced (Avanzata)

La procedura guidata Advanced (Avanzata) dà accesso ad opzioni non disponibili nella procedura Quick Start (Avvio Rapido), quali la configurazione dell'ottimizzazione del gain.

Per usare la procedura guidata Advanced (Avanzata), selezionare un modello facendo due volte clic sul nome dello stesso nell'elenco sotto la scheda Advanced (Avanzate) della finestra New Run (Nuovo processo).



Le opzioni del modello fornite in questa finestra sono simili a quelle della procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido) (sezione 5.1.1).

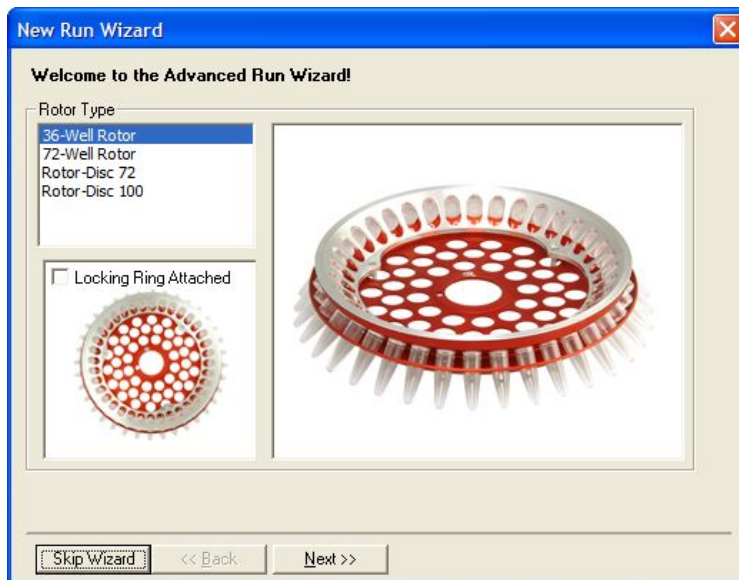
Perform Last Run (Esegui ultimo processo):	Perform Last Run (Esegui ultimo processo) importa le definizioni di ciclo, acquisizione e campioni dell'ultimo processo aperto nel software.
Empty Run (Processo a vuoto):	si tratta di un processo a vuoto che permette all'utente di definire tutti i parametri del profilo.
Three Step with Melt (Tre fasi con fusione):	questo è un profilo di ciclo a due fasi con acquisizione di 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 temperatura (Optical Temperature Verification, OTV). Per ulteriori informazioni, vedere la sezione 9. Questo modello è bloccato per garantire il funzionamento sempre perfetto del profilo.

Nota: i modelli definiti dall'utente possono essere aggiunti all'elenco 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.

Finestra 1 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)

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

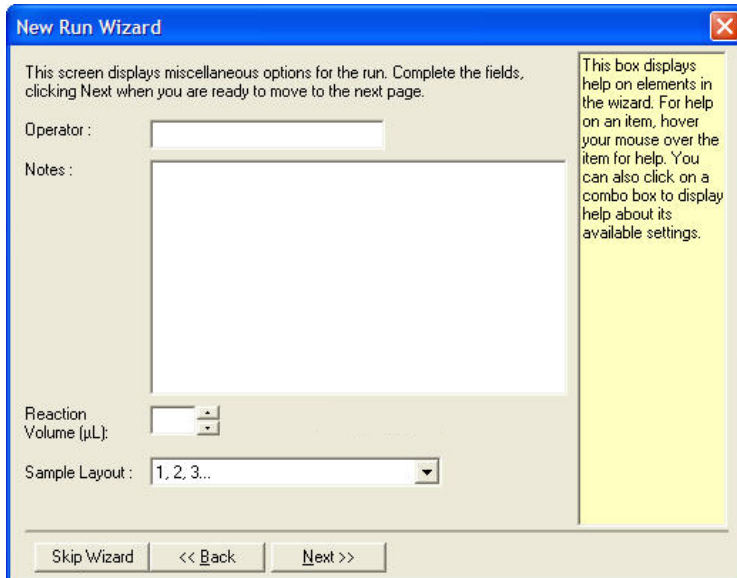
Selezionare la casella di controllo Locking Ring Attached (Anello di bloccaggio applicato) e fare clic su Next (Avanti).



Finestra 2 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)

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

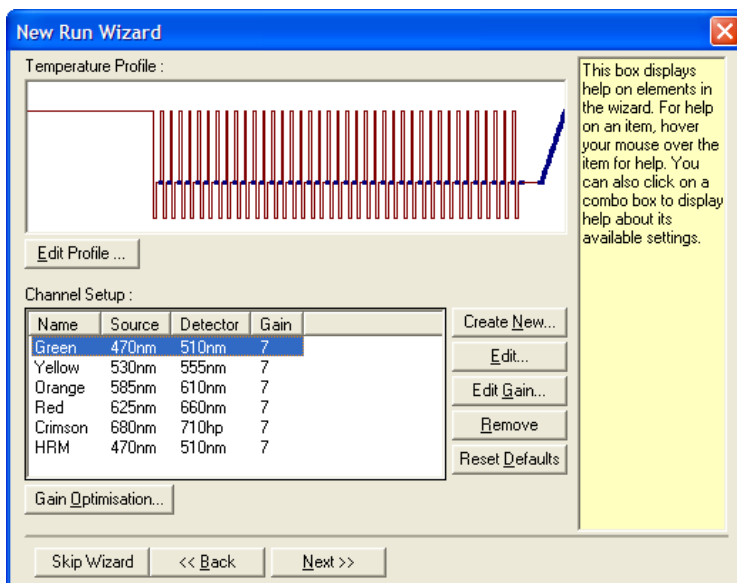
Se nella finestra 1 è stato selezionato 72-Well Rotor, nel menu a tendina sono disponibili tre opzioni di Sample Layout (Layout campioni). "1, 2, 3..." è l'opzione predefinita. La maggior parte degli utenti sceglie questa opzione. Si dovrebbe invece scegliere "1A, 1B, 1C..." quando i campioni sono stati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



Finestra 3 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)

In questa finestra, è possibile modificare Temperature Profile (Profilo di temperatura) e Channel Setup (Setup canale). Se è stato fatto clic sul pulsante Edit Profile... (Modifica profilo...), viene visualizzata la finestra Edit Profile (Modifica profilo), che consente di modificare le condizioni del ciclo e di selezionare i canali di acquisizione (sezione Edit Profile (Modifica profilo)).

Dopo aver configurato il profilo, fare clic sul pulsante Gain Optimisation... (Ottimizzazione gain...) per visualizzare la finestra Gain Optimisation (Ottimizzazione gain) (vedere pagina 62).



Modifica profilo

La finestra Edit Profile (Modifica profilo) 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 pagina 45). Il profilo è visualizzato in forma grafica. L'elenco dei segmenti del profilo viene visualizzato sotto la visualizzazione grafica. Tale elenco può includere Hold (Mantieni) (pagina 53), Cycling (Ciclo) (pagina 54), Melt (Fusione) (pagina 54) o HRM se lo strumento ha un canale HRM (pagina 57).

Ogni stadio del profilo può essere modificato facendo clic sull'area appropriata del display grafico o sul nome nell'elenco e poi cambiando le impostazioni visualizzate.

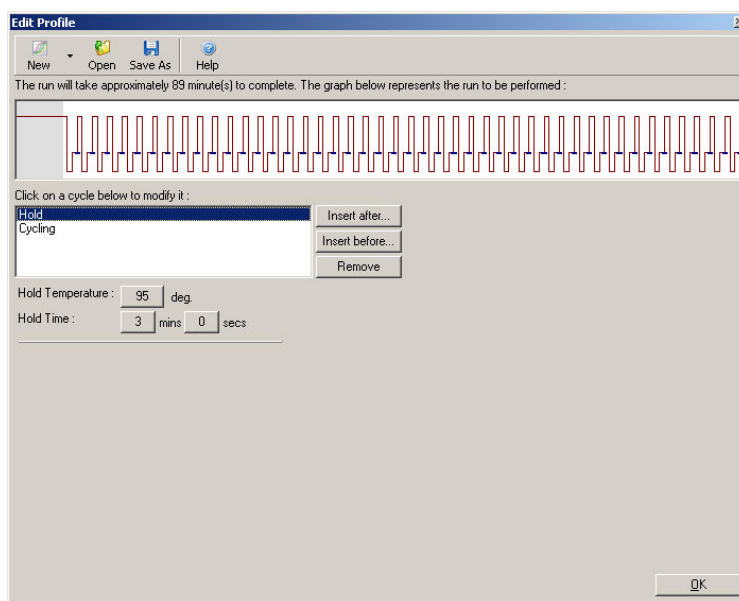
Insert after... (Inserisci dopo...): Permette di aggiungere un nuovo ciclo dopo quello selezionato.

Insert before... (Inserisci prima...): Permette di aggiungere un nuovo ciclo prima di quello selezionato.

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

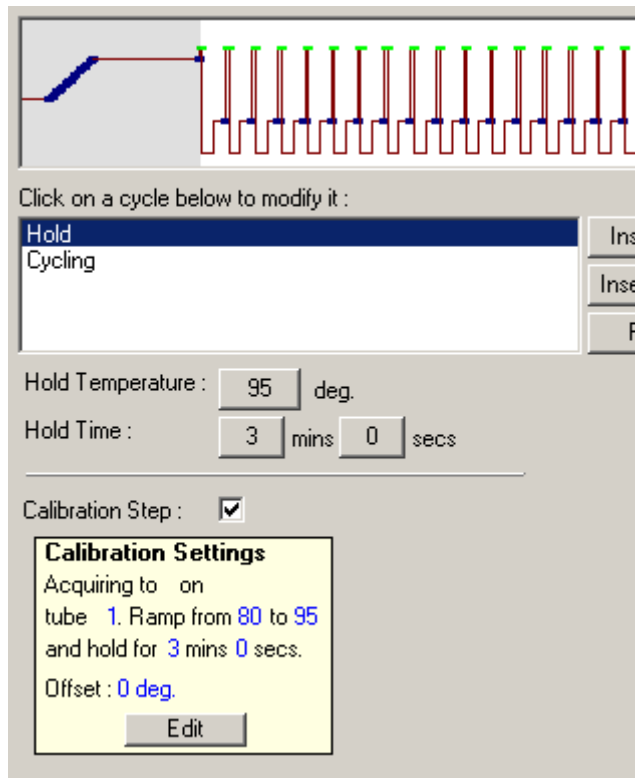
Mantenimento

Il comando Hold (Mantieni) impone al Rotor-Gene Q MDx di rimanere alla temperatura designata per un tempo definito. Per cambiare la temperatura, fare clic sul pulsante Hold Temperature (Mantieni temperatura) e immettere la temperatura desiderata con la tastiera o la barra scorrevole. Per cambiare la durata del comando Hold (Mantieni), fare clic sui pulsanti Hold Time (Durata mantenimento), mins (minuti) e secs (secondi).



Se si esegue un ciclo di denaturazione ottica, si può usare il mantenimento come fase di calibrazione. In questo caso, viene eseguita una fusione di calibrazione prima del mantenimento.

Questa è la configurazione predefinita per il primo mantenimento del processo, che però può essere cambiata se lo si desidera.



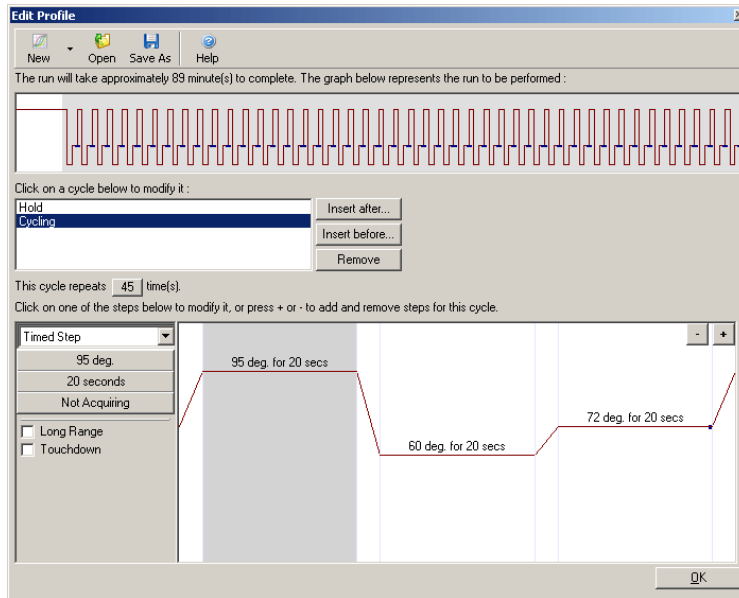
Per maggiori informazioni sul ciclo di denaturazione ottica, vedere pagina 57.

Ciclizzazione

Il comando Cycling (Ciclizzazione) ripete le fasi di temperatura e tempo definite dall'utente 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 la 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, fare clic sulla fase e utilizzare i 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 mantenimento della fase selezionata di un secondo per ogni nuovo ciclo.

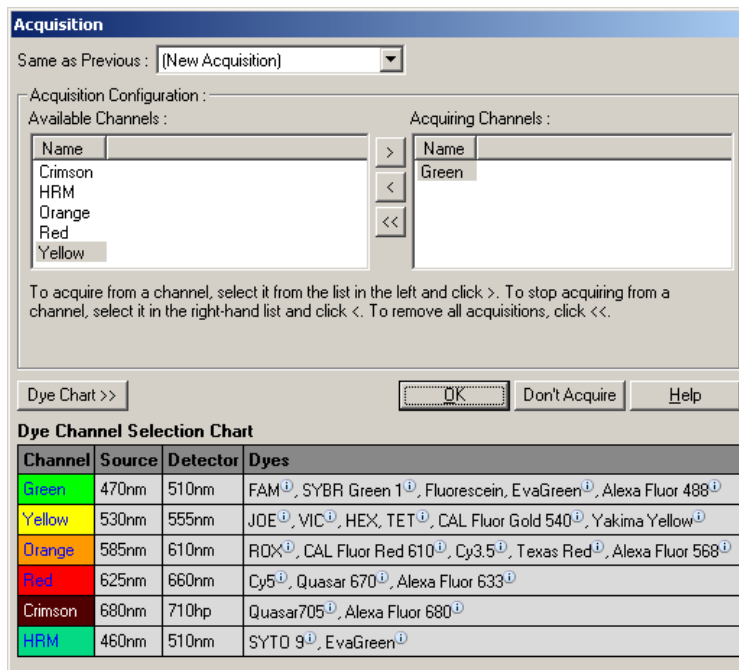
Touchdown: selezionando questa casella si diminuisce la temperatura di un numero specifico di gradi per un numero specifico di cicli iniziali. Questo è poi visualizzato sul display.

Acquisizione

I dati possono essere acquisiti su qualsiasi canale in qualsiasi fase del ciclo. Per impostare un canale per l'acquisizione di dati, fare clic 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 fatto clic su Not acquiring (Senza acquisizione), viene visualizzata la finestra Acquisition (Acquisizione).



Per impostare un canale d'acquisizione, selezionare il canale e spostarlo dall'elenco "Available Channels" (Canali disponibili) all'elenco "Acquiring Channels" (Canali di acquisizione) mediante il pulsante **>**. Per rimuovere un canale selezionato dall'elenco "Acquiring Channels" (Canali di acquisizione), usare il pulsante **<**. Il pulsante **<<** rimuove tutti i canali dall'elenco "Acquiring Channels" (Canali di acquisizione). Anche facendo clic sul 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 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.

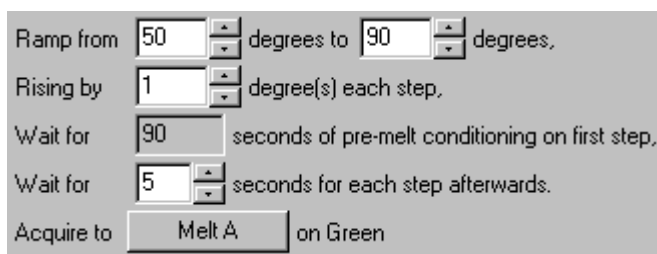
Le opzioni di acquisizione descritte sopra sono applicabili anche alle fasi di fusione, tranne nel caso in cui non sia possibile allegare dati di acquisizione con il menu Same as Previous (Come precedente).

Fusione e ibridazione

Una 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 un processo di Fusione, 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 (Fusione A) nella schermata sottostante, può essere cambiata facendo clic sul pulsante. Verrà visualizzata la finestra Acquisition (Acquisizione) 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 Melt A 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 tra le fasi termiche varia a seconda del numero di gradi fra ogni fase.

Fusione ad alta risoluzione

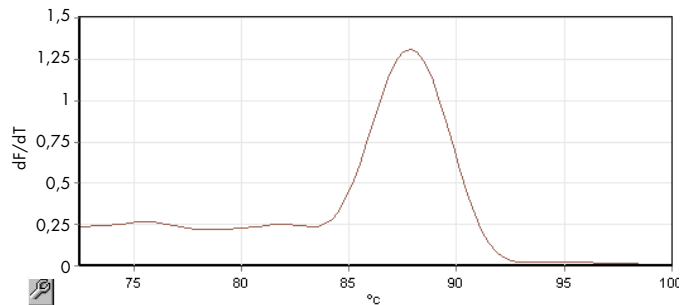
L'analisi di fusione ad alta risoluzione (High resolution melt, HRM) caratterizza i campioni di DNA a doppio filamento sulla base del loro comportamento di dissociazione (fusione). È simile all'analisi classica della curva di fusione, ma fornisce molte più informazioni per una gamma più vasta di applicazioni. 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 10).

Ciclizzazione di denaturazione ottica

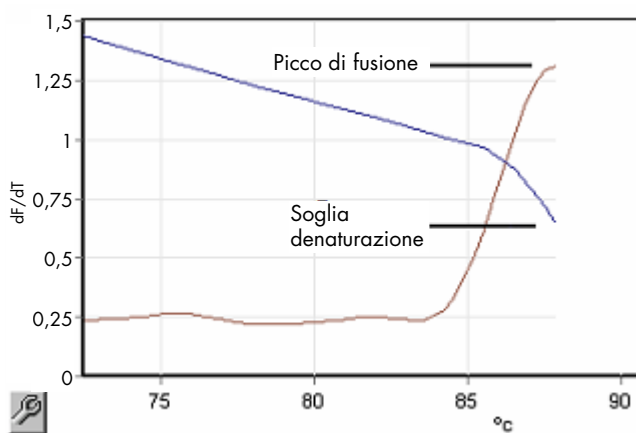
La ciclizzazione di denaturazione ottica è una tecnica molto interessante, disponibile sul Rotor-Gene Q MDx, che esegue l'analisi di fusione in tempo reale per determinare il picco di fusione di un campione di riferimento. Questo indica una denaturazione del prodotto PCR con precisione maggiore che non 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 impostazione predefinita viene eseguita una fusione sul canale verde da 80 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. Quando 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 di interesse 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 di seguito).

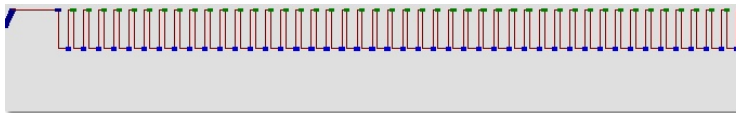
Un ciclo di denaturazione ottica si presenta quasi identico agli altri cicli. La differenza principale consiste nella fase di fusione inserita automaticamente all'inizio del profilo e nel profilo netto della fase di denaturazione durante il ciclo. Il ciclo di denaturazione ottica non richiede tempi di 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. Si tratta della stessa temperatura della fase di denaturazione in un profilo di ciclizzazione standard.
- La posizione della provetta del campione PCR che produrrà una curva di fusione sul canale verde.
- È obbligatorio definire un profilo di ciclizzazione di denaturazione ottica.

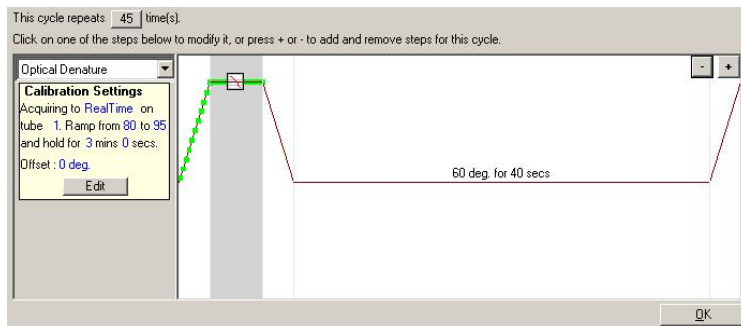
Creare un nuovo ciclo di denaturazione ottica come segue.

1. Aprire la finestra Edit profile (Modifica profilo). Quindi fare clic su New (Nuovo). Nella finestra che si apre, fare clic sul pulsante Insert after (Inserisci dopo) e selezionare New Cycling (Nuova ciclizzazione) dal menu. Selezionare una delle fasi di temperatura facendo clic sul grafico. Nel menu a tendina selezionare Optical Denature (Denaturazione ottica) al posto di Timed Step (Fase temporizzata). Viene visualizzato un profilo predefinito contenente una fase di denaturazione e una fase di ciclo di denaturazione ottica.

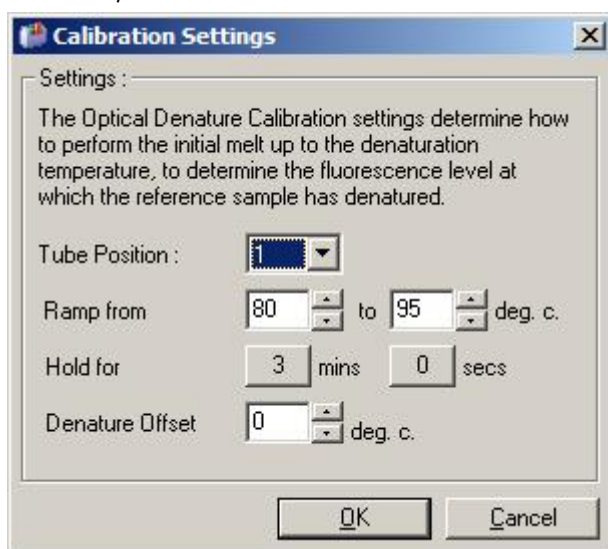


La regione a rampa all'inizio del processo rappresenta il processo di calibrazione. I puntini verdi rappresentano le acquisizioni effettuate per ogni ciclo durante il riscaldamento. I puntini blu rappresentano l'acquisizione alla fine della fase di annealing a 60°C. Tenere presente che, mentre il profilo 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. Fare clic sulla prima metà del grafico con il simbolo della denaturazione ottica . Sulla sinistra dello schermo compaiono le informazioni Calibration Settings (Impostazioni calibrazione).

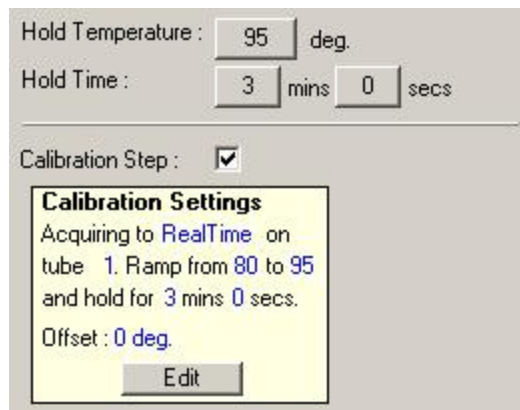


3. Le informazioni "Calibration Settings" (Impostazioni calibrazione) di norma sono corrette. Per modificarle, se necessario, fare clic su Edit (Modifica). Si apre la finestra Calibration Settings (Impostazioni calibrazione).



4. Accertarsi di quanto segue:
- La provetta indicata in Tube Position (Posizione provetta) 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 appropriato. Il valore predefinito di 0°C è appropriato per la maggior parte delle fusioni. Le fusioni con transizioni molto nette possono richiedere un offset di denaturazione compreso tra -0,5°C e -2°C, come definito dall'utente, per assicurare il rilevamento della transizione.

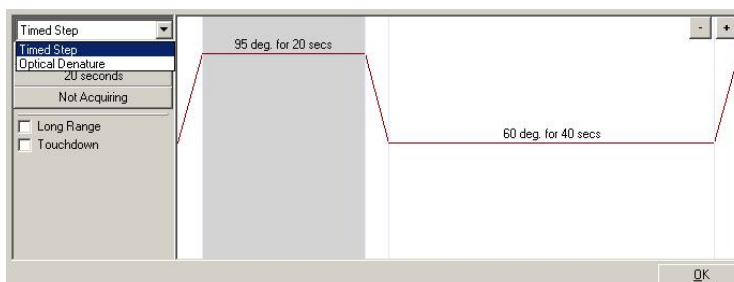
È possibile anche definire una fase di denaturazione introducendo una nuova fase di sospensione. Fare clic su Insert before (Inserisci prima) e selezionare New Hold at Temperature (Nuova sospensione alla temperatura) dal menu. Saranno visualizzate le impostazioni di calibrazione.




Le impostazioni di calibrazione sono sincronizzate con quelle di denaturazione; pertanto, una modifica del tempo di sosta nella fase di denaturazione aggiorna automaticamente il tempo di sosta nella calibrazione. Questo perché 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 ciclizzazione, selezionare il ciclo nell'elenco della finestra Edit Profile (Modifica profilo). Quindi selezionare la fase di denaturazione facendo clic su di essa sul display.



Fare clic sul menu a tendina e selezionare Optical Denature (Denaturazione ottica). La temperatura e il tempo di sospensione vengono rimossi e viene visualizzata l'icona Optical Denature (Denaturazione ottica) .

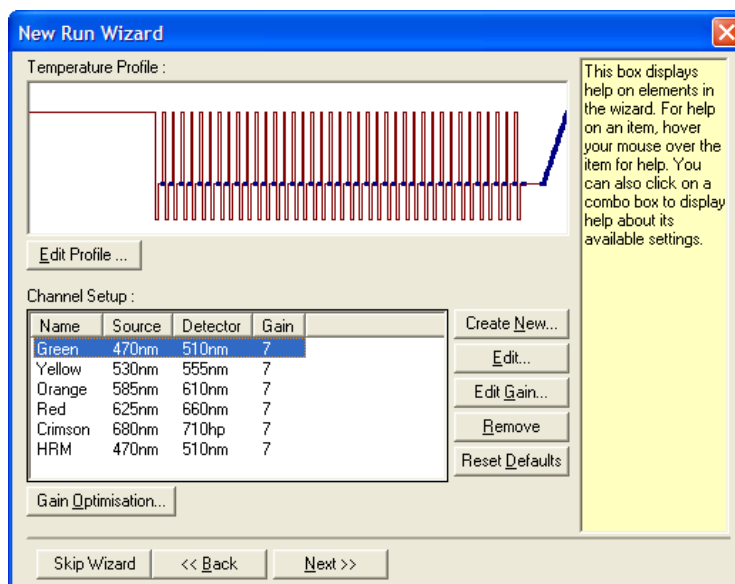
Ottimizzazione gain

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

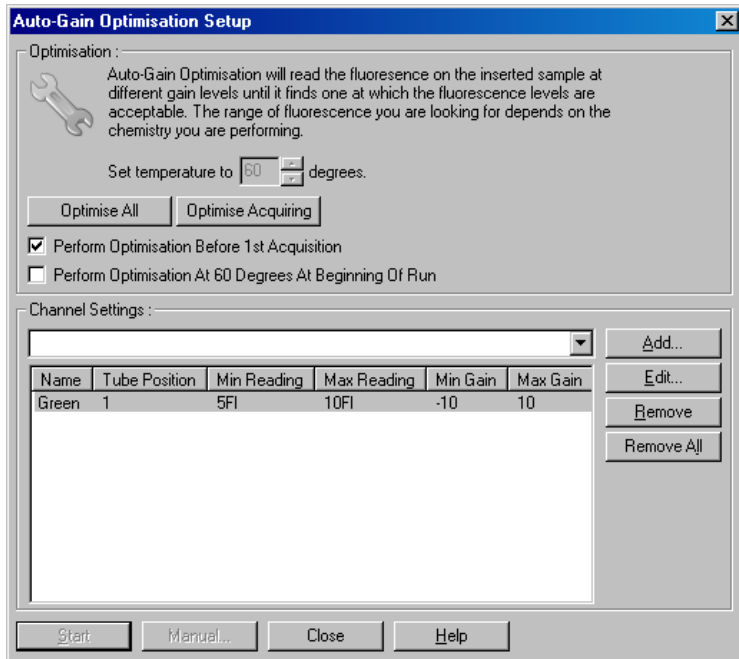
Il range di gain per ogni canale va da -10 a 10, dove -10 rappresenta la sensibilità minima e 10 quella massima.

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 l'ottimizzazione ottica per determinare l'impostazione migliore del gain. Se il gain scelto con Ottimizzazione gain dà un segnale poco efficace, è necessario aumentare il Target Sample Range (Range campione target). Se dà un segnale saturo, è necessario diminuire il valore di Target Sample Range (Range campione target).

Per eseguire la funzione Ottimizzazione gain, fare clic sul pulsante Gain Optimisation... (Ottimizzazione gain...) nella finestra 3 di New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo) (vedere Finestra 3 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)).



Viene visualizzata la finestra Auto-Gain Optimisation Setup (Setup automatico ottimizzazione gain). La finestra consente l'ottimizzazione mediante la regolazione automatica delle impostazioni del gain fino a che i valori per tutti i canali selezionati non rientrano all'interno o al di sotto di una certa soglia.



Set temperature to (Imposta temperatura su):

Prima della lettura, il Rotor-Gene Q MDx verrà raffreddato o riscaldato in modo da corrispondere alla temperatura specificata. Per impostazione predefinita, questa temperatura viene impostata come temperatura d'acquisizione.

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

Optimise All (Ottimizza tutto) tenterà di ottimizzare tutti i canali noti al software. Optimise Acquiring (Ottimizza acquisizione) ottimizzerà soltanto i canali che vengono usati nel profilo termico definito nel processo (ciclizzazione e fusione).

Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Esegui ottimizzazione prima della prima acquisizione):

Selezionare questa casella per eseguire l'Ottimizzazione gain al primo ciclo in cui si verifica l'acquisizione di dati. Questa opzione è consigliata per la funzione Ottimizzazione gain automatica.

Perform Optimisation At [x] Degrees At Beginning of Run (Esegui ottimizzazione a [x] gradi all'inizio del processo):

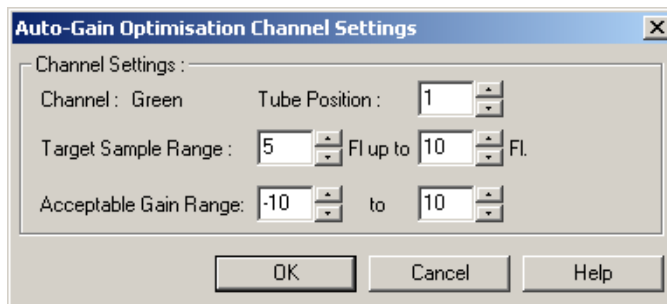
Selezionare questa casella per eseguire l'Ottimizzazione gain prima di iniziare il processo. Il Rotor-Gene Q MDx viene riscaldato alla temperatura specificata, viene eseguita l'Ottimizzazione gain e quindi inizia la ciclizzazione dalla prima fase, di solito una fase di denaturazione. Si può scegliere questa opzione se una Ottimizzazione gain eseguita durante il processo comporterebbe un tempo eccessivo dedicato alla fase iniziale. Di solito si preferisce Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Esegui ottimizzazione prima della prima acquisizione) perché l'Ottimizzazione gain 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 di interesse e fare clic su Add (Aggiungi).

Edit (Modifica):

Si visualizza così una finestra in cui si può impostare il Target Sample Range (Range campione target). Target Sample Range (Range campione target) è il range di fluorescenza iniziale da impostare per il campione nella provetta specificata. Ottimizzazione gain automatica 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 Target Sample Range (Range campione target). Nell'esempio mostrato, Auto-Gain Optimisation (Ottimizzazione gain automatica) 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 (Range campione target) di 1-3 FI, mentre un range di 5-10 FI è più adatto ai prodotti chimici per sonda.



Remove/Remove All (Rimuovi/Rimuovi tutto):

Remove (Rimuovi) elimina il canale evidenziato. Remove All (Rimuovi tutto) rimuove tutti i canali.

Start (Avvia):

Start (Avvia) dà inizio a Gain Optimisation (Ottimizzazione gain). Viene selezionato un gain in grado di dare livelli del segnale di fluorescenza entro il range specificato. Se la fluorescenza non rientra nel range specificato, il gain viene impostato in modo da dare la massima corrispondenza possibile.

Manual (Manuale):

Apri la finestra Manual Gain Adjustment (Regolazione manuale gain).

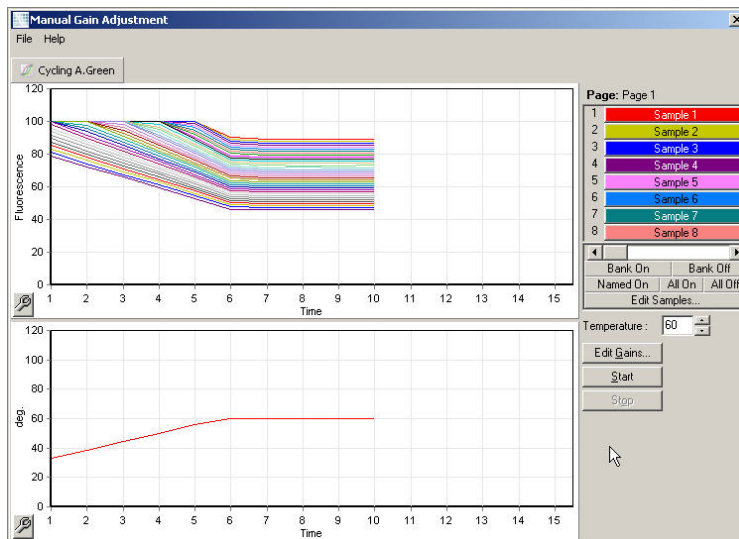
Changing Gain During a Run (Modifica del gain durante un processo):

Se il gain all'inizio del processo era troppo alto o troppo basso, può essere modificato durante i primi dieci cicli. Nel punto in cui il gain è stato modificato, viene visualizzata una linea verticale. I cicli prima del cambiamento sono esclusi dall'analisi.

Nota: Ottimizzazione gain può selezionare un'impostazione che non rientra nel range specificato. Questo può essere dovuto a variazioni nella fluorescenza dopo la prima fase di sospensione. Il risultato dell'Ottimizzazione gain fornisce tuttavia una buona indicazione del livello di fluorescenza da cui partirà il processo.

Regolazione manuale del gain

Per eseguire "Manual Gain Adjustment" (Regolazione manuale del gain), fare clic su Manual... (Manuale...) nella finestra Auto-Gain Optimisation Setup (Impostazione ottimizzazione gain automatica). Viene visualizzata la finestra Manual Gain Adjustment (Regolazione manuale del gain). 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.



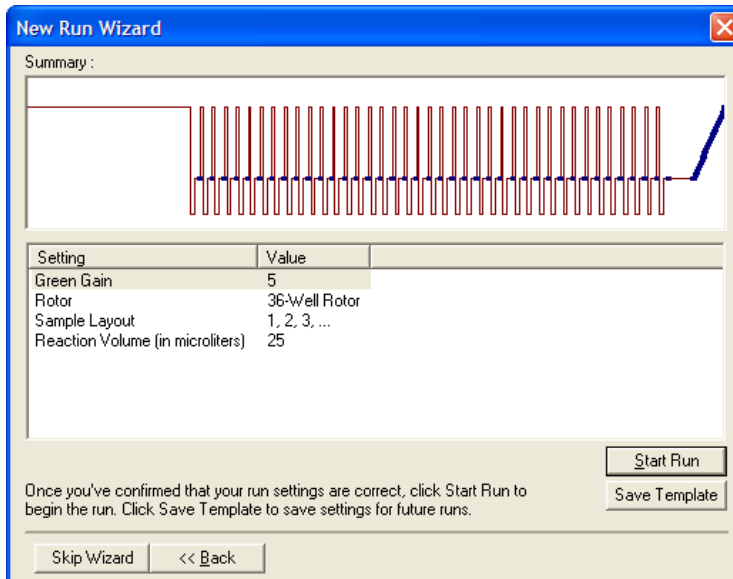
Per impostazione predefinita, tutti i campioni sono visualizzati sul display. I campioni possono essere eliminati o aggiunti al display mediante il toggler a destra. Il toggler è composto da celle colorate, ognuna corrispondente a un campione visualizzato. I campioni nelle celle a colori brillanti sono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

Consigliamo di eseguire Manual Gain Adjustment (Regolazione manuale del gain) come segue.

1. Regolare la temperatura nella finestra Manual Gain Adjustment (Regolazione manuale del gain) 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. Fare clic su Start (Avvia). 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, fare clic 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 per acquisire ogni punto di ogni canale e nel frattempo l'interfaccia utente è disattivata.
6. Ripetere il processo finché il valore FI non raggiunge il livello desiderato.
7. Fare clic su Stop (Arresta). Se il processo sta ancora acquisendo dati quando si fa clic sul pulsante Stop (Arresta), il Rotor-Gene Q MDx completa prima l'acquisizione e quindi si arresta. Questo processo può richiedere fino a 5 secondi per ogni canale di acquisizione.

Finestra 4 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)

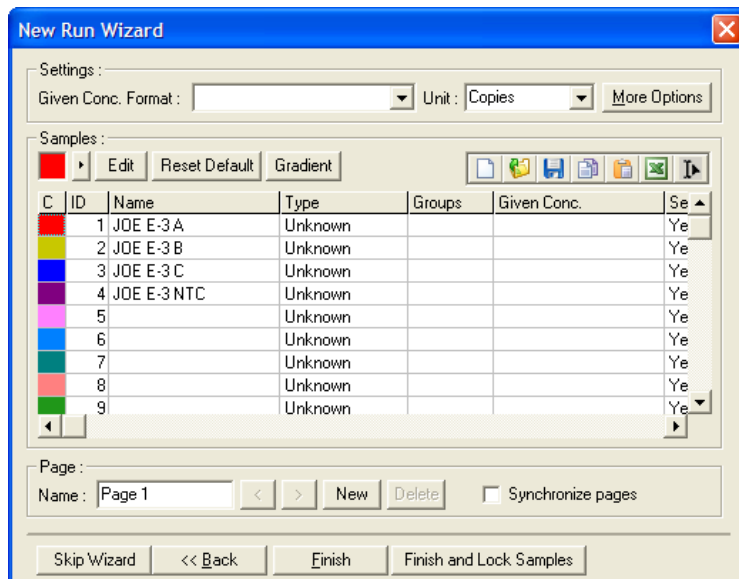
Questa finestra riepiloga il processo. Controllare i parametri e, se sono corretti, fare clic su Start Run (Avvia processo). Sarà richiesto il nome di un file. Si possono anche salvare le impostazioni del processo come modello per processi futuri con il pulsante Save Template (Salva modello)-



Finestra 5 New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo)

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 (Modifica campioni) (pagina 129). 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 i nomi dei campioni. Per ulteriori informazioni su questa e altre funzionalità di sicurezza, vedere "Protezione dell'accesso per il software Rotor-Gene Q" (pagina 135).



5.2 Uso dell'hardware del Rotor-Gene Q MDx

5.2.1 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 36-Well Rotor e 72-Well Rotor sono in dotazione allo strumento. I Rotor-Disc® rotor 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 Informazioni per gli ordini). 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 sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.

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

CAUTELA**Danni allo strumento**

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

36-Well Rotor

Il 36-Well Rotor è di colore rosso. Il 36-Well Rotor e il 36-Well Rotor Locking Ring consentono l'uso di provette da 0,2 ml. Non è necessario 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.

**72-Well Rotor**

Il 72-Well Rotor è di colore blu. Il 72-Well Rotor e il 72-Well Rotor Locking Ring sono utilizzati con le provette per Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, utilizzabili per volumi anche di soli 20 µl. I tappi forniscono una chiusura sicura e affidabile.



Rotor-Disc 72 Rotor

Il Rotor-Disc 72 Rotor è di colore grigio scuro. Il Rotor-Disc 72 Rotor e il Rotor-Disc 72 Locking Ring 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 5.2.3.



Rotor-Disc 100 Rotor

Il Rotor-Disc 100 Rotor è di colore oro. Il Rotor-Disc 100 Rotor e il Rotor-Disc 100 Locking Ring 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, ovvero 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 5.2.3.



Specifiche del rotore

Tipo di rotore	Capacità pozzetto (µl)	N. campione	Tipo di provetta	Volume di reazione raccomandato (µl)
36-Well Rotor	200	36	PCR Tubes, 0.2 ml	20-50
72-Well Rotor	100	72	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	20-50
Rotor-Disc 72 Rotor	100	72	Rotor-Disc, 72	20-25
Rotor-Disc 100 Rotor	30	100	Rotor Disc, 100	15-20

Nota: Il 36-Well Rotor e il 72-Well Rotor 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.

5.2.2 Setup della reazione

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

Si possono preparare le reazioni con il Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes (per PCR Tubes, 0.2 ml), il Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (per Strip Tubes and Caps, 0.1 ml preparate con pipetta monocanale), il Loading Block 72 x 0.1 ml Multi-channel (per provette per strisce e tappi, 0,1 ml preparate con pipetta multicanale), il Rotor-Disc 72 Loading Block (per il Rotor-Disc 72), o il Rotor-Disc 100 Loading Block (per il Rotor-Disc 100). Tutti i blocchi sono in alluminio e possono essere pre-raffreddati.

Il Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (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 72-Well Rotor. La stessa procedura può essere usata per il setup della reazione con il 36-Well Rotor e accessori relativi.

1. Inserire le provette per strisce nel blocco di caricamento e definire le aliquote dei componenti della reazione.

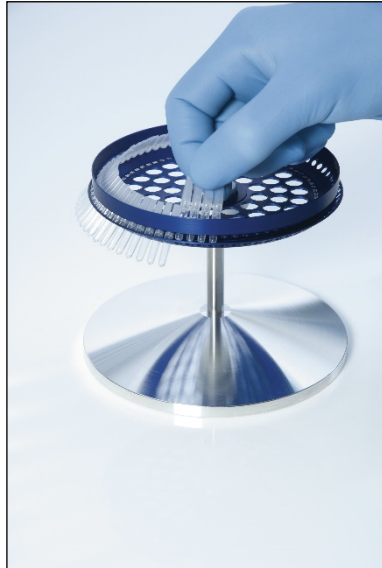


2. Inserire saldamente i tappi sulle provette per strisce e ispezionare visivamente per confermare la tenuta ermetica.



3. Inserire le provette per strisce nel 72-Well Rotor accertandosi che ogni provetta sia correttamente inserita nel suo posto con l'orientamento corretto.

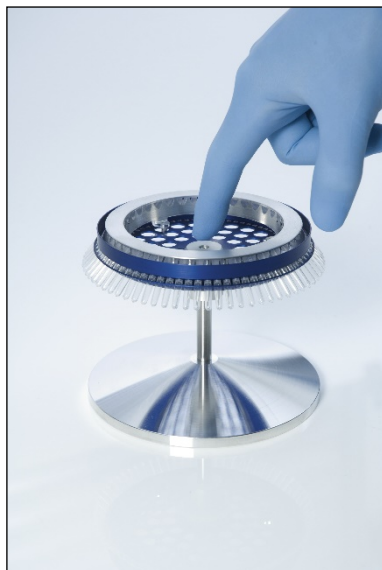
I campioni non raggiungono un allineamento ottimale sul sistema di rilevamento se non sono correttamente inseriti nel rotore. Potrebbe derivarne una riduzione del segnale di fluorescenza acquisito e della sensibilità di rilevamento. Con lo strumento è fornito in dotazione un Rotor Holder che facilita 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 il 72-Well Rotor Locking Ring 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.



- 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, spingere semplicemente in basso il mozzo del rotore per sganciarlo ed estrarlo.



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

5.2.3 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 Rotor-Disc Heat Sealing Film, sigillata a caldo con apposito Rotor-Disc Heat Sealer. 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 Rotor-Disc Heat Sealer.

- Accendere il Rotor-Disc Heat Sealer mediante l'interruttore sul retro a sinistra.
Si accende la spia rossa "Power". Il Rotor-Disc Heat Sealer richiede 10 minuti circa per raggiungere la temperatura d'esercizio, poi si accende una spia verde "Ready" (Pronto).
- Scegliere una chiusura permanente o rimovibile.
Nota: una volta che il Rotor-Disc Heat Sealer è pronto, è possibile lasciarlo in funzione costantemente in tutta sicurezza.
- Inserire il Rotor-Disc nel Rotor-Disc Loading Block usando la linguetta della posizione uno sul Rotor-Disc e i fori di guida per le provette sul Rotor-Disc Loading Block.

4. Preparare le reazioni nel Rotor-Disc mediante pipettamento manuale o mediante il sistema automatico di manipolazione dei liquidi.



5. Per rimuovere la parte centrale da un foglio di Rotor-Disc Heat Sealing Film, 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" (ALTO) sia posizionata in fondo al Rotor-Disc Loading Block.

Il foro centrale della pellicola dovrebbe inserirsi agevolmente sul cilindro del Rotor-Disc Loading Block e sopra il Rotor-Disc.



7. Infilare il gruppo nel Rotor-Disc Heat Sealer mediante le guide sul lato del Rotor-Disc Loading Block. Controllare che il Rotor-Disc Loading Block 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 Rotor-Disc Loading Block non è in posizione corretta, l'allarme è dato da un segnale acustico.
10. La fine della sigillatura è segnalata da un bip e dal lampeggiamento della spia arancione "Sealing" (Sigillatura in corso). Spingere a basso la barra blu anodizzata per riportare il meccanismo sigillante nella posizione originale.

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

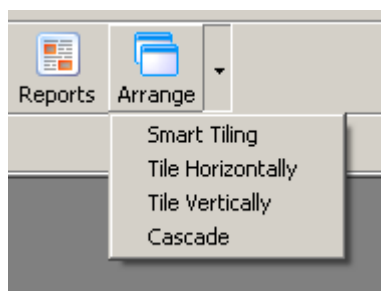
Nota: per avvisare in caso di rilascio accidentale del meccanismo di blocco, la spia lampeggiante arancione "Sealing" (Sigillatura in corso) si illuminerà in maniera fissa e il bip continuo cambierà in un suono intermittente.

11. Estrarre il Rotor-Disc Loading Block dal Rotor-Disc Heat Sealer. Lasciare che la pellicola si raffreddi per circa 10 secondi. Rimuovere la pellicola in eccesso premendo verso il basso per staccarla. Non tirare verso l'alto una quantità eccessiva di pellicola.
12. Rimuovere il Rotor-Disc dal Rotor-Disc Loading Block.
13. Caricare il Rotor-Disc nel rotore mediante la linguetta di riferimento posizione uno come guida per un corretto orientamento.

6 Interfaccia utente analisi

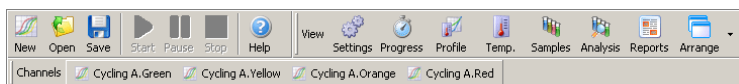
6.1 Spazio di lavoro

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 facendo clic sul pulsante Arrange (Disponi) sulla barra degli strumenti. Per la disposizione delle finestre, sono disponibili diverse opzioni che possono essere selezionate facendo clic sulla freccia verso il basso accanto al pulsante Arrange (Disponi).



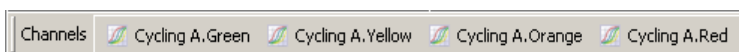
6.2 Barra degli strumenti

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



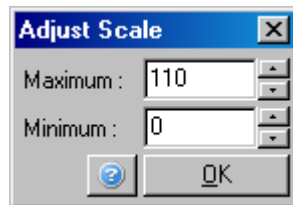
6.3 Visualizzazione canali dati grezzi

Fare clic 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 modificarne la presentazione. I dati grezzi possono anche essere trasformati per facilitare diversi tipi di analisi.

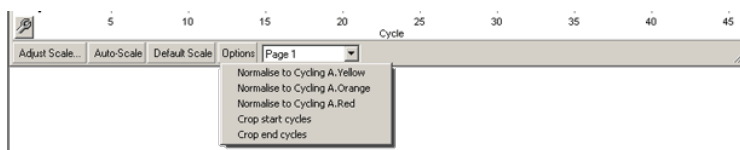
Adjust Scale (Definizione scala): Per selezionare Adjust Scale (Definizione scala), fare clic con il pulsante destro del mouse sulla finestra appropriata. Adjust Scale (Definizione scala) richiama una finestra in cui si può specificare una scala.



Autoscale (Scala automatica): Autoscale (Scala automatica) tenta di adattare la scala ai valori massimi e minimi dei dati.

Default Scale (Scala predefinita): Default Scale (Scala predefinita) ripristina la scala di visualizzazione da 0 a 100 unità di fluorescenza.

Icona chiave inglese: Per ulteriori informazioni, vedere la sezione 7.5.



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, ad esempio, ROX, acquisiti in un altro canale.

Crop start cycles (Elimina cicli iniziali): Viene creata 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 determinate sostanze chimiche.

Crop end cycles (Elimina cicli finali): Viene creata 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 (Modifica campione) consente la creazione di più definizioni del campione. Ad 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, perché l'utente può facilmente cambiare visualizzazione tra il gene di interesse e i campioni housekeeping mediante la definizione di 2 pagine campione.

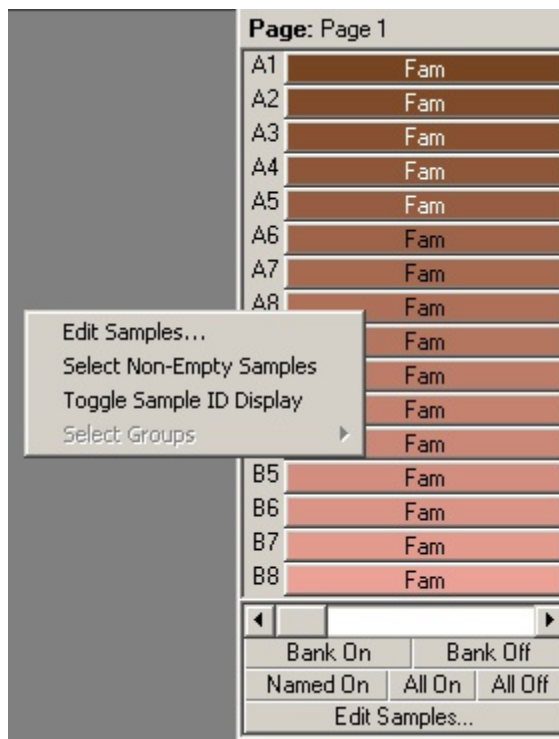
6.4 Passaggio da un campione all'altro

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 e viene 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 facendo clic sulla cella oppure trascinando il puntatore del mouse su diverse celle contemporaneamente. I pulsanti Bank On (Banca attiva) e Bank Off (Banca non attiva) 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.

Facendo clic su Named On (Campioni con nome) si visualizzano solo i campioni a cui è stato dato un nome. Si tratta di un modo rapido per mostrare solo campioni rilevanti. Facendo clic su All On (Tutti attivi) All Off (Tutti disattivati) si visualizzano rispettivamente tutti campioni nel rotore o nessuno. Con il pulsante Edit Samples... (Modifica campioni) si apre la finestra Edit Samples (Modifica campioni) in cui si possono modificare nome e tipo dei campioni e le concentrazioni standard (vedere la sezione 6.8.4).

Il toggler è illustrato sotto. Le opzioni aggiuntive vengono visualizzate facendo clic 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. Ad 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 6.8.4.

Toggle Sample ID Display
(Alterna visualizzazione ID
campioni):

Se si utilizza un 72-Well Rotor, i campioni vengono mostrati nel formato da A1 ad A8, B1 a B8 e così via. L'opzione Toggle Sample ID Display (Alterna visualizzazione ID campioni) consente all'utente di passare a un ordine campioni numerico (da 1 a 72).

Select Non-Empty Samples
(Selezionare campioni non vuoti):

Questa opzione deseleziona qualsiasi campione con un Type (Tipo) specificato come None (Nessuno) nella finestra Edit Samples (Modifica campioni). Questo garantisce che siano visualizzati solo i campioni pertinenti per l'analisi.

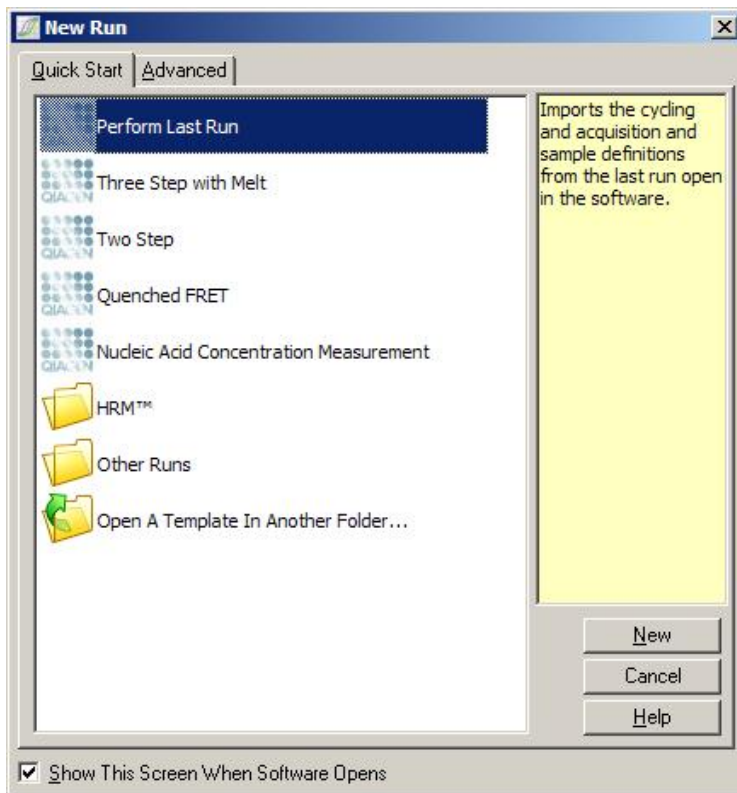
Select Groups
(Seleziona gruppi):

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. Ad esempio, si possono definire gruppi di campioni dei pazienti trattati e non trattati. I gruppi possono essere impostati nella finestra Edit Samples (Modifica campioni).

6.5 Menu File

6.5.1 Nuovo

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



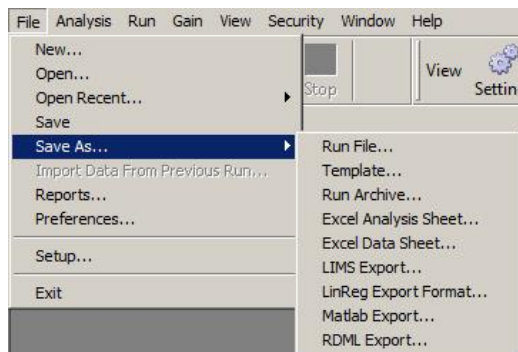
Per informazioni sui modelli forniti, vedere la sezione 5.1.1 e la sezione 5.1.2.

Nuovo processo

New (Nuovo):	Avvia l'impostazione del processo servendosi del modello selezionato.
Cancel (Annulla):	Chiude questa finestra.
Help (Guida):	Apri la guida online.
Show This Screen When Software Opens (Mostra questa schermata all'apertura del software):	Selezionando questa casella, quando viene avviato il software si visualizza la finestra New Run (Nuovo processo).

6.5.2 Apri e Salva

- Open... (Apri...):** Apre un file di processo Rotor-Gene Q (*.rex) o un archivio dei processi Rotor-Gene Q (file *.rea).
- Open Recent... (Apri file recenti...):** 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... (Salva con nome):** Usare questa funzione per salvare il file o i dati del processo in vari formati. Le opzioni sono elencate di seguito.
- Run File... (File di 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 e-mail.
- LIMS Export (Esportazione LIMS):** Salva l'analisi in formati LIMS compatibili secondo le esigenze dell'utente. Per maggiori informazioni, contattare i servizi tecnici QIAGEN.
- 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 LingReg...):** Esporta tutti i dati grezzi del canale in un formato che può essere letto da LinReg (uno strumento di analisi dell'efficienza). Per ulteriori informazioni, vedere "Export to LinReg (Esportazione in LinReg)" di seguito.
- Matlab Export... (Esportazione in Matlab...):** Esporta i dati in un formato che può essere letto dal pacchetto scientifico Matlab (o da Octave, il suo equivalente open-source). Può essere utile per la ricerca dei metodi.
- RDML Export (Esportazione RDML):** Offre un'esportazione file compatibile con RDML v1.1. Il file di esportazione RDML creato è un file in formato XML con compressione ZIP, con un'estensione file *.rdml ed è compatibile con il documento schema RDML (https://rdml.org/rdml_v_1_1.html) fornito sul sito Web: https://rdml.org/rdml_v_1_1.html.

Esportazione in LinReg

LinReg è uno strumento sviluppato da C. Ramakers e collaboratori.* Lo strumento LinReg è disponibile su: <https://medischebiologie.nl/files/>.

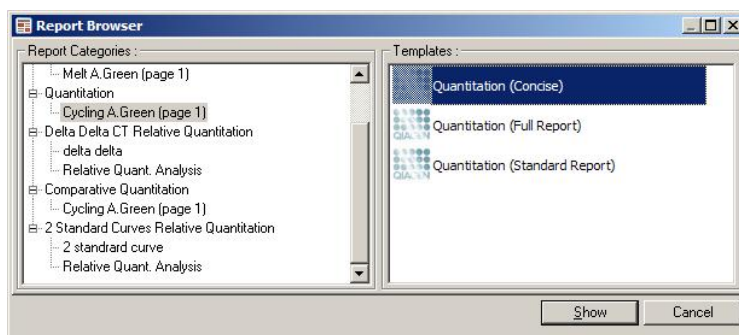
Il software Rotor-Gene Q permette all'utente di esportare dati grezzi in un formato che può essere importato dallo strumento LinReg per l'analisi.

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... (Salva con nome) e poi LinReg Export Format... (Formato di esportazione LingReg).
3. Microsoft Excel visualizza automaticamente i dati grezzi esportati.
4. Avviare lo strumento LinReg.

Lo strumento chiede di selezionare il range di celle in cui si trovano i dati grezzi. Lo strumento può analizzare un solo canale di dati grezzi per volta, quindi è necessario selezionare un'area appropriata del foglio Excel.

6.5.3 Report

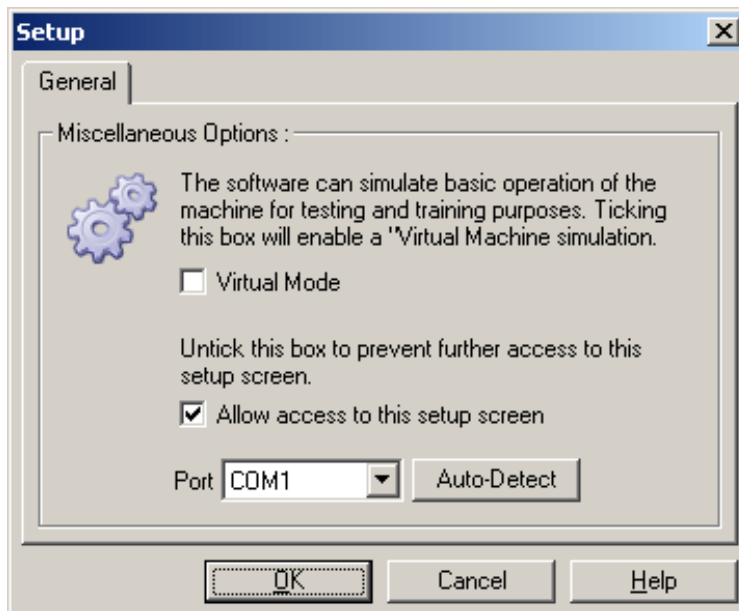
Dopo aver selezionato Reports (Report) viene visualizzata la finestra Report Browser (Browser dei report). Se i dati sono stati già analizzati, il report dell'analisi può essere visualizzato dalla finestra Report Browser (Browser dei report). Sono disponibili vari tipi di report con diversi gradi di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



* 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.

6.5.4 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.



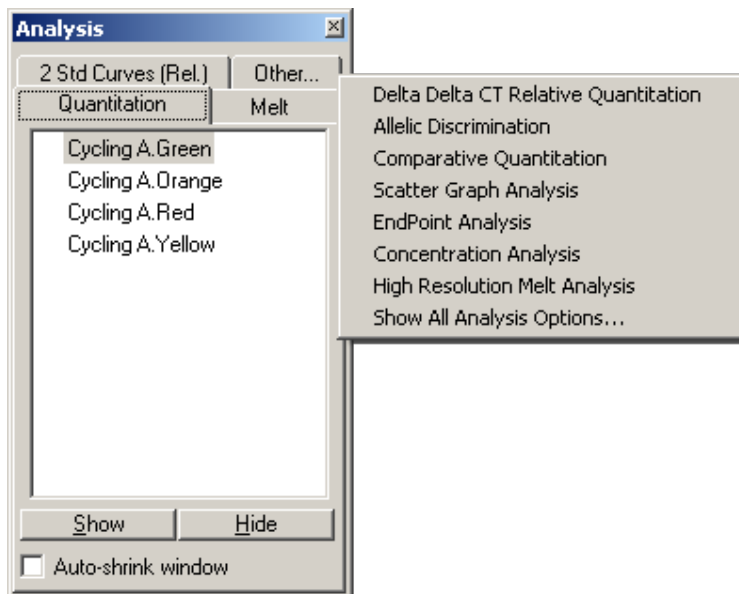
Virtual Mode (Modalità virtuale):	Selezionare questa opzione se il software sarà utilizzato senza connessione a un Rotor-Gene Q MDx. Il software mantiene tutte le funzioni. Questa modalità è utile a fini dimostrativi, per l'analisi dei dati e l'impostazione di modelli.
Allow access to this setup screen (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 (Porta):	Selezionare la porta di comunicazione corretta per consentire la comunicazione tra il computer e il Rotor-Gene Q MDx.
Auto-Detect (Rilevamento automatico):	Se non si è sicuri di quale porta selezionare, fare clic su Auto-Detect (Rilevamento automatico) per ricercare tutte le porte disponibili.

6.6 Menu Analisi

6.6.1 Analisi

Dopo aver fatto clic su Analysis (Analisi) viene visualizzata la finestra Analysis (Analisi). Questa finestra consente la creazione di nuove analisi e la visualizzazione di analisi esistenti. Servirsi delle schede per selezionare il metodo di analisi. Viene mostrato un elenco dei canali che possono essere analizzati con il metodo scelto. È possibile eseguire più processi di esami indipendenti nello stesso canale, purché siano state impostate come pagine separate nella finestra Edit Samples (Modifica campioni). 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 di analisi specifica.

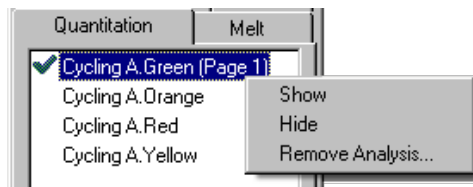


Auto-shrink window
(Ridimensionamento automatico):

Selezionando Auto-shrink window (Ridimensionamento automatico) 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 avvia 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 fare clic su Arrange (Disponi) sulla barra degli strumenti. Le finestre si disporranno automaticamente secondo il metodo Smart Tiling (Disposizione intelligente). In alternativa, scegliere un altro metodo di disposizione facendo clic sulla freccia accanto al pulsante Arrange (Disponi). Anche facendo clic con il pulsante destro sul nome dell'analisi si hanno a disposizione altre opzioni.



Show (Mostra):

Visualizza l'analisi selezionata.

Hide (Nascondi):

Nasconde l'analisi selezionata.

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

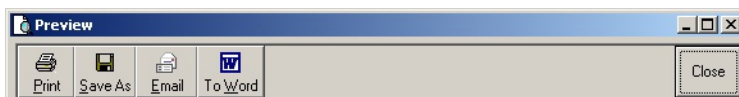
Elimina completamente l'analisi selezionata. Questo significa che andranno perdute tutte le impostazioni di normalizzazione o i setup dei bin di fusione.

6.6.2 Quantificazione

Selezionare la scheda Quantitation (Quantificazione) nella finestra Analysis (Analisi) e fare doppio clic sul nome del canale o selezionare il canale e quindi premere il pulsante Show (Mostra) per aprire il canale di interesse. Si aprono tre finestre: la schermata principale, la curva standard e i risultati.

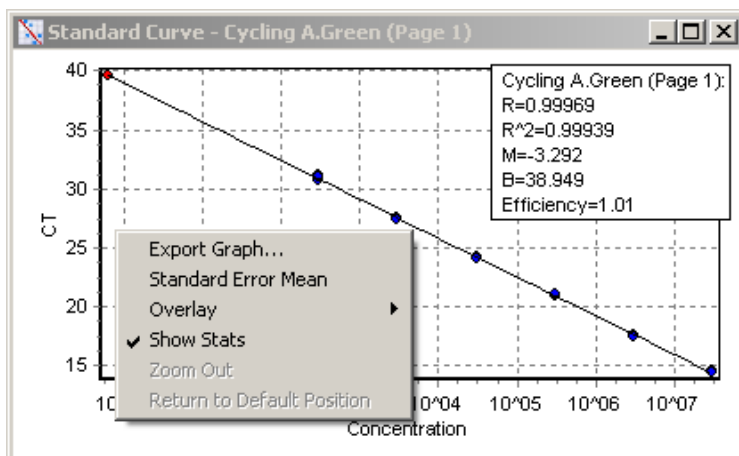
Report

Reports (Report): Reports (Report) apre la finestra Report Browser (Browser dei report) nella quale è possibile generare un report dell'analisi corrente. Le opzioni disponibili sono 3: report standard, report completo e report conciso. Fare doppio clic 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 (Anteprima) per stampare, salvare o inviare un report per e-mail oppure esportarlo in Word.



Curva standard

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

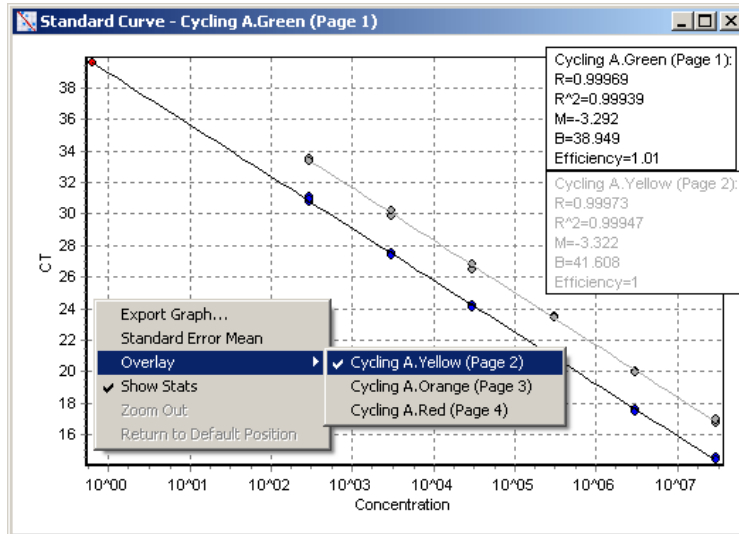


I valori sulla curva standard sono ricalcolati dinamicamente se si varia il livello di soglia facendo clic sulla linea di soglia e trascinandola nella finestra principale.

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

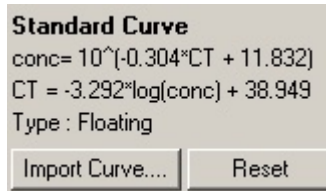
Nota: se si ridefiniscono gli standard per ricalcolare la curva standard, escludendo la visibilità del campione standard mediante il toggler sulla destra dello schermo si rimuove il campione dal calcolo della curva standard. La rimozione degli standard dal grafico per aumentare il valore R² non ha valore 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 pagina 94.
- R² value (correlation coefficient) (Valore R² - coefficiente delle correlazioni): Il valore R², o valore R², è la percentuale dei dati coerente con l'ipotesi che gli standard formino una curva standard. Se il valore R² 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 R² è all'incirca di 0,999.
Nota: è possibile ottenere un valore R² alto con una curva standard non valida se si è usato un numero insufficiente di standard. Il valore R² migliora man mano che il numero degli standard diminuisce. Per un'indicazione più precisa dell'affidabilità dei risultati, usare come guida l'intervallo di confidenza sulle concentrazioni calcolate.
- R value (square root of correlation coefficient) (Valore R (radice quadrata del coefficiente delle correlazioni)): Il valore R è la radice quadrata del valore R². In generale, il valore R² 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" (Curva standard).
- Export Graph... (Esporta grafico): Facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla curva standard si visualizza l'opzione di esportazione del grafico (vedere la sezione 7.4).
- Overlay (Sovrapposizione): Se si sono eseguite più analisi quantitative nello stesso processo, è possibile sovrapporre le curve 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

"conc = ...*CT + ..." e "CT = ..." sono 2 versioni dell'equazione utilizzata per mettere in rapporto i valori CT e le concentrazioni. Nelle pubblicazioni, la formula maggiormente usata è "CT = ...". La curva standard può essere o "Floating" (Fluttuante) o "Fixed" (Fissa). Se "Floating" (Fluttuante), viene calcolata un'equazione ottimale per la curva standard ogni volta che la soglia viene spostata nella finestra principale. Se "Fixed" (Fissa), l'equazione non cambia perché è stata importata da un altro processo.



Importazione curva

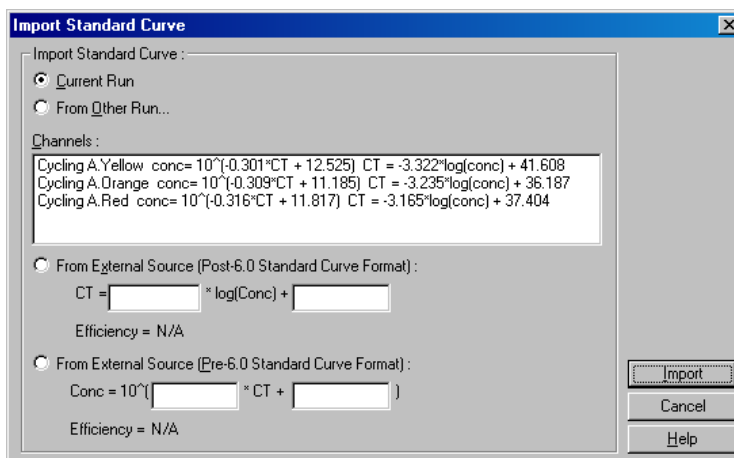
L'importazione di una curva standard permette la stima delle concentrazioni quando in un processo particolare non è disponibile una curva standard e l'efficienza della reazione non è cambiata tra 2 processi. Le curve possono essere importate da un altro canale o da un altro processo facendo clic su Import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

Se necessario, la curva standard può essere regolata. Regolare la curva standard significa che si importa nel processo corrente solo l'efficienza della curva standard sorgente. Dipende dalle sostanze chimiche usate se la curva standard deve essere regolata o meno.

Per regolare la curva standard, usare nel nuovo processo un riferimento di concentrazione nota. Definire un riferimento impostando il tipo di campione su "Standard" immettendo un valore di concentrazione nella finestra Edit Samples (Modifica campioni). 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. Ad 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 curva passa a "Fixed" (Fissa). Fare clic su Reset (Ripristina) per riportare a "Floating" (Fluttuante) il tipo di curva standard.

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

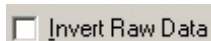


Utilizzando questa finestra, si può importare una curva standard per un altro canale analizzato nel processo corrente o da un altro processo.

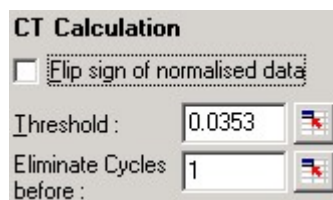
Current Run (Processo corrente):	Quando è selezionata questa opzione, le analisi di quantificazione su altri canali ottenute con questo processo sono elencate con le curve standard corrispondenti.
From Other Run... (Da un altro processo...):	Selezionando questa opzione, si apre una finestra di dialogo da cui si può selezionare un file di processo da aprire. Se per il processo è stata eseguita un'analisi di quantificazione, sono elencate le curve standard per ogni canale analizzato. Nota: le impostazioni dell'analisi di quantificazione devono essere state salvate nel file.
Channels (Canali):	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, ad esempio, un foglio di calcolo Excel.

Calcolo C_T

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



Calcoli 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 delle curve, si stabilisce il valore di C_T per ogni campione.
Threshold (Soglia):	Per impostare la soglia, fare clic sull'icona (griglia con freccia rossa), quindi fare clic sul grafico e trascinare la linea sul livello desiderato. In alternativa, immettere un valore logaritmico. In alternativa, è possibile 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.



Eliminate Cycles before (Elimina cicli precedenti a):	Per impostare, fare clic sull'icona (griglia con freccia rossa), quindi fare clic 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, ad esempio, a causa di effetti di miscelazione del campione.
Auto-Find Threshold (Trova soglia automaticamente):	Questa funzione esplora la regione selezionata del grafico per trovare un'impostazione della soglia che dia stime ottimali di determinate 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 analizzato per ottenere la migliore corrispondenza della curva standard sulla base dei campioni che sono stati definiti come standard (ovvero in cui il valore R è più prossimo a 1,0).



Risultati

Aprire la finestra Quantitation Results (Risultati quantificazione). Per impostazione predefinita, si apre questa finestra quando si apre un'analisi. Se la finestra è stata chiusa, utilizzare questo comando per riapirla.

Analysis	No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc	Calc. Conc (c)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Std	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc	Rep. Calc. Conc (95% CI)
Cycling A.Green (Page 1)	1	Red	10e8	Standard	3.73		1.00E+08	7.15E+07	28.1%	3.73	0.00	(3.73, 3.74)	7.17E+07	(1.17E+07, 4.39E+08)
Cycling A.Green (Page 1)	2	Red	10e8	Standard	3.74		1.00E+08	7.17E+07	28.3%					
Cycling A.Green (Page 1)	3	Red	10e8	Standard	3.74		1.00E+08	7.16E+07	28.4%					
Cycling A.Green (Page 1)	4	Orange	10e7	Standard	6.11		1.00E+07	1.44E+07	44.0%	6.06	0.06	(5.91, 6.21)	1.49E+07	(3.29E+06, 6.73E+07)
Cycling A.Green (Page 1)	5	Orange	10e7	Standard	6.08		1.00E+07	1.47E+07	46.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	6	Orange	10e7	Standard	5.98		1.00E+07	1.56E+07	65.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	7	Green	10e6	Standard	10.43		1.00E+06	7.72E+05	22.8%	10.38	0.09	(10.15, 10.60)	8.00E+05	(2.62E+05, 2.44E+06)
Cycling A.Green (Page 1)	8	Green	10e6	Standard	10.27		1.00E+06	8.58E+05	14.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	9	Green	10e6	Standard	10.43		1.00E+06	7.71E+05	22.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	10	Green	10e5	Standard	13.49		1.00E+05	9.66E+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	Green	10e5	Standard	13.75		1.00E+05	8.13E+04	18.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	12	Green	10e5	Standard	13.69		1.00E+05	8.48E+04	15.2%					
Cycling A.Green (Page 1)	13	Blue	10e4	Standard	15.66		1.00E+04	2.24E+04	123.7%	15.46	0.25	(14.84, 16.08)	2.56E+04	(7.62E+03, 8.36E+04)
Cycling A.Green (Page 1)	14	Blue	10e4	Standard	15.54		1.00E+04	2.42E+04	141.7%					
Cycling A.Green (Page 1)	15	Blue	10e4	Standard	15.18		1.00E+04	3.08E+04	208.8%					
Cycling A.Green (Page 1)	16	Blue	10e3	Standard	21.36		1.00E+03	4.71E+02	52.9%	21.09	0.24	(20.49, 21.69)	5.65E+02	(8.13E+01, 3.50E+03)
Cycling A.Green (Page 1)	17	Blue	10e3	Standard	20.89		1.00E+03	6.47E+02	36.9%					
Cycling A.Green (Page 1)	18	Blue	10e3	Standard	21.02		1.00E+03	5.94E+02	40.6%					
Cycling A.Green (Page 1)	19	Black	10e2	Standard		NEG (Multi Ct)	1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	20	Black	10e2	Standard	23.98		1.00E+02	7.99E+01	20.1%					
Cycling A.Green (Page 1)	21	Black	10e2	Standard		NEG (Multi Ct)	1.00E+02							
Cycling A.Green (Page 1)	22	Black	NTC	NTC		NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1)	23	Black	NTC	NTC		NEG (NTC)								
Cycling A.Green (Page 1)	24	Black	NTC	NTC		NEG (NTC)								

Nella finestra Quantitation Results (Risultati quantificazione) i risultati del processo sono riepilogati in una tabella. Facendo clic con il pulsante 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 calcolo esistente, selezionare invece l'opzione Copy (Copia), aprire il foglio di calcolo e selezionare Paste (Incolla).

La finestra Quantitation Results (Risultati quantificazione) include le seguenti colonne.

- Analyses (Analisi): Il set di dati corrente (canale di acquisizione e pagina campione).
- No. (N.): 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.
- C_T Comment (Commento C_T): Annotazione automatica della determinazione di C_T se sono esclusi i valori C_T. Sono possibili i seguenti flag:
 - NEG (Multi Ct): la soglia interseca la curva di fluorescenza almeno due volte (doppia intersezione). Non è possibile determinare un valore C_T inequivocabile.
 - 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). Ad esempio, una curva di fluorescenza interseca la soglia data, ma il generale minor aumento della pendenza suggerisce un controllo senza template e non viene dato un valore C_T.
 - 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 (Rimozione valori estremi) (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.

%Var	La variazione percentuale tra la concentrazione calcolata e quella nota. %Var=Abs(calcolata/data-1)
Rep. Ct (Ct rep.):	il CT medio di tutti i campioni con lo stesso nome di questo campione.
Rep. Ct Std. Dev. (Dev. Std. Ct rep.):	la deviazione standard del valore CT di tutti i campioni con lo stesso nome di questo campione.
Rep. Ct. C.I. 95% (I.C. 95% Ct. rep.):	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. (Conc. calc. rep.):	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. (I.C. 95% conc. calc. rep.):	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. Per confrontare i termociclatori, consigliamo di confrontare la deviazione standard del valore CT.

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

Nota: Eccetto per le colonne Color (Colore), Name (Nome), Ct e Ct Comment (Commento Ct) ogni colonna può essere visualizzata o nascosta facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla finestra e poi selezionando o deselezionando 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		Rep. Calc. Conc. (95% CI)	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 di interesse. Selezionare i risultati di interesse 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.

Ct	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	f
14.42	30000000	2825064	5.8%	
14.59	30000000	25142920	16.2%	
14.40	30000000	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	30000	30786	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, laddove possibile, genera solo informazioni che siano utili.

Ad esempio:

- Non è possibile ottenere un intervallo di confidenza del 95% da una serie di concentrazioni calcolate selezionate, perché 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. Ad esempio, un valore di 1,07537 rappresenta una variazione del 7,54% $(278.974-322.611)/(300.000/1,07537-00.000*1,07537)$. 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" (Ordine di grandezza).
- Per le concentrazioni calcolate, viene usata la media geometrica invece di quella aritmetica. Questa tiene conto della natura esponenziale della real-time PCR. Ad esempio, in caso di doppie diluizioni con 1, 2, 8 e 16 copie, la media dovrebbe essere 4 copie, perché 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 impostazione predefinita 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, perché 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 di quantificazione 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 facendo clic su Dynamic Tube (Provetta dinamica) perché si potrebbero ottenere risultati di quantificazione 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 graduale 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 su questa linea. Selezionando questa opzione mediante clic sul pulsante Slope Correct (Correzione pendenza) si possono migliorare i dati dei replicati se le linee base dei campioni sono inclinate in modo significativo. 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).

Laddove la pendenza non è stabile o i cicli iniziali della linea di base mostrano una riduzione o un aumento significativo del segnale rispetto al resto della curva, la Correzione della pendenza del rumore può dar luogo ad alcuni effetti indesiderati, ad esempio curve con controllo negativo che attraversano la soglia a causa dell'approssimazione della linea di base come linea ottimizzata e che normalizzano i dati grezzi di conseguenza. Pertanto, questa funzione non sempre migliora la qualità dei dati e deve essere utilizzata solo se le curve dei dati grezzi mostrano una pendenza stabile.

Regolazione del punto di takeoff

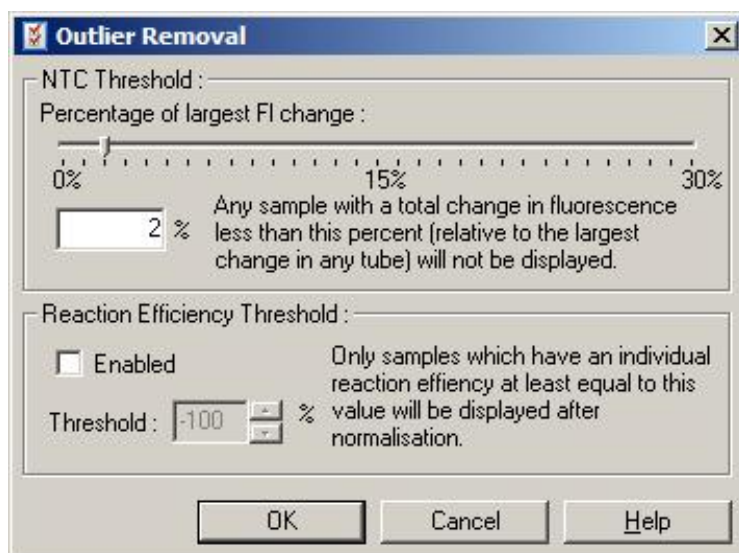
L'algoritmo di regolazione del punto di takeoff può essere utilizzato per definire una lunghezza minima della linea di base usata per la normalizzazione. Per applicare la regolazione del punto di takeoff, è necessario definire due parametri. Se il punto di takeoff viene calcolato mediante la Dynamic Tube (Provetta dinamica) che è inferiore al primo parametro, come punto di takeoff viene utilizzato il secondo parametro. La regolazione del punto di takeoff può essere utilizzata solo insieme alla normalizzazione con Dynamic Tube (Provetta dinamica).

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. È possibile ignorare un massimo di 10 cicli. Se tuttavia i primi cicli appaiono simili a quelli successivi, si otterranno risultati migliori deselezionando "Ignore First" perché l'algoritmo di normalizzazione avrà più dati su cui lavorare.

Rimozione valori estremi

Per distinguere tra cambiamenti trascurabili della fluorescenza e reazioni effettive nei controlli senza template (No Template Controls, NTC), sono previste 2 misure: NTC Threshold (Soglia NTC) e Reaction Efficiency Threshold (Soglia di efficienza della reazione). Si consiglia NTC Threshold (Soglia NTC) per la maggior parte delle applicazioni. L'approccio usato deve essere convalidato.



NTC Threshold (Soglia NTC):

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" (Soglia NTC) sarà inserito nel report e nella colonna "CT Comment" (Commento CT) sarà visualizzato un flag "NEG (NTC)".

La percentuale è relativa al più ampio cambiamento massimo trovato in una provetta. Ad 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" (Soglia NTC) del 10% considererebbe come rumore ogni campione inferiore a 4,5 FI.

Reaction Efficiency Threshold (Soglia di efficienza della reazione):

La soglia "Reaction Efficiency Threshold" (Soglia di efficienza della reazione) è un metodo alternativo per escludere il rumore dall'analisi. Questo algoritmo di normalizzazione usa tecniche di stima dell'efficienza della reazione nella quantificazione comparativa (vedere la sezione 6.6.6). Tutti i campioni che non hanno un'efficienza di reazione almeno a questo livello vengono esclusi e nella colonna "CT Comment" (Commento CT) verrà visualizzato un flag "NEG (R.Eff)".

Un livello dello 0% indica che non ha avuto luogo alcuna 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 CT corrispondente nella finestra Quantitation Results (Risultati quantificazione). Al tempo stesso, nella colonna "Ct Comment" (Commento CT) sarà visualizzato un flag indicante l'esclusione. Perciò è importante che la colonna "Ct Comment" (Commento CT) rimanga sempre visualizzata.

Nell'immagine sottostante, i campioni 7, 8 e 9 sono stati esclusi a causa della "Reaction Efficiency Threshold" (Soglia di efficienza della reazione).

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 Standard Curve (Curva standard)) 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 pagina 82) e nella finestra Standard Curve (Curva standard).

La pendenza è calcolata come il cambiamento in C_T diviso per il cambiamento dell'immissione log (ad esempio, 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 un'efficienza della reazione di 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

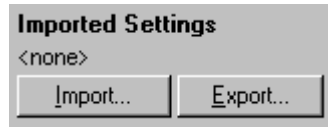
La finestra principale visualizza i diagrammi di amplificazione su una scala logaritmica.

Facendo clic su Linear Scale (Scala lineare) in fondo alla finestra si passa dalla scala logaritmica alla scala lineare e viceversa. Il passaggio da una scala all'altra comporta solo il cambiamento della visualizzazione non quello dei calcoli. Ciò può essere verificato con lo strumento puntatore facendo clic con il pulsante destro del mouse sul grafico e selezionando Show pinpointer (Mostra puntatore). Usando una scala logaritmica, i valori più piccoli 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 dell'analisi di quantificazione

I modelli di analisi di quantificazione 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 la sezione 7.1.



6.6.3 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 relativa curva standard. L'espressione del gene di interesse è poi normalizzata con il gene normalizzante (spesso un gene costitutivo).

È importante che gli standard e i campioni replicati siano designati correttamente durante il setup del campione (vedere la sezione "Preparazione del campione"). In particolare, i campioni corrispondenti devono avere lo stesso nome in ciascuna analisi. In una reazione multipla, in cui le provette del gene di 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 (vale a dire che le reazioni vengono 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 di 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 tra le 2 analisi sulla base dei nomi.

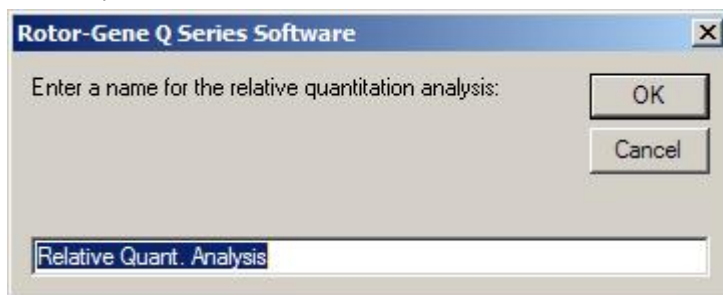
Analisi dell'espressione con il metodo della curva a due standard

I dati possono essere dapprima analizzati per ogni gene mediante analisi di quantificazione. Altrimenti, i risultati di ogni gene saranno determinati automaticamente mediante lo strumento Autofind Threshold (Rilevamento automatico soglia).

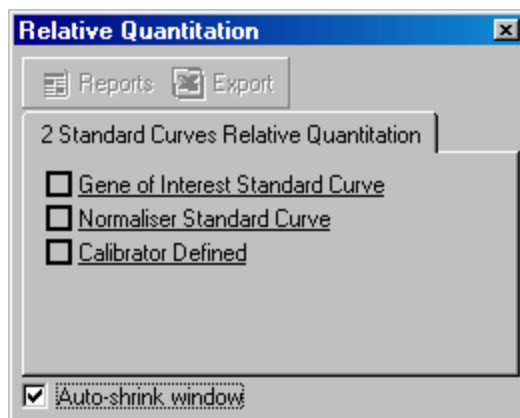
1. Dalla finestra Analysis, selezionare la scheda 2 Std Curve (Rel.) (Curva a due standard). Fare clic su New Analysis... (Nuova analisi...).

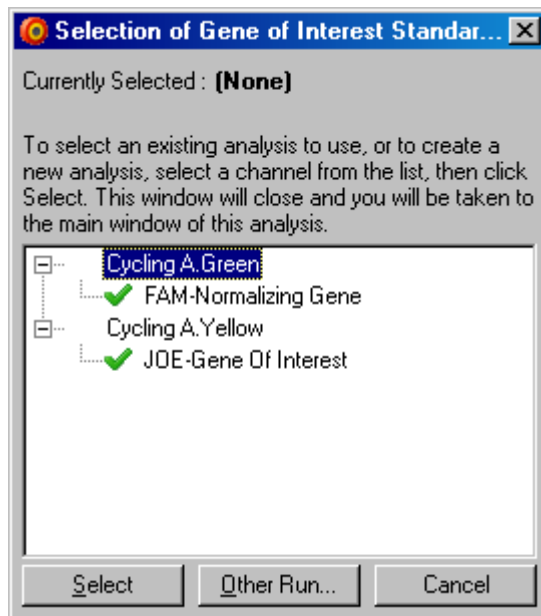


2. Immettere un nome per l'analisi.

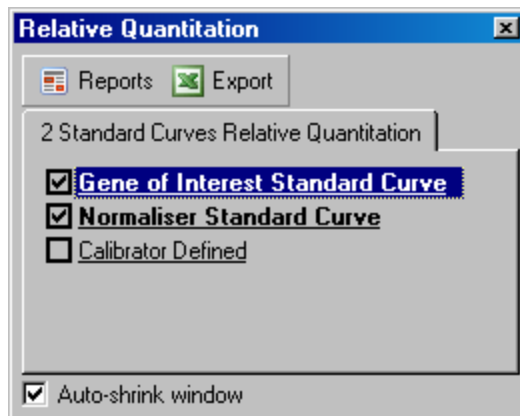


3. Indicare le pagine usate per l'analisi del gene normalizzante e per l'analisi del gene di interesse. Ad esempio, facendo clic su Gene of Interest Standard Curve (Curva standard del gene di interesse) si apre la finestra Selection of Gene of Interest Standard... (Selezione dello standard del gene di interesse...). Selezionare la pagina in cui è stato quantificato il gene di 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 vengono calcolate in relazione a questo campione.

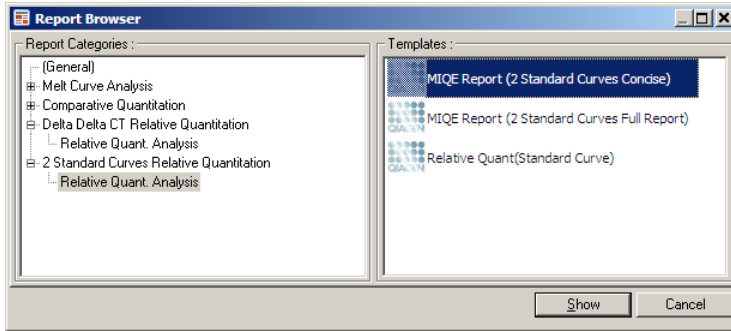




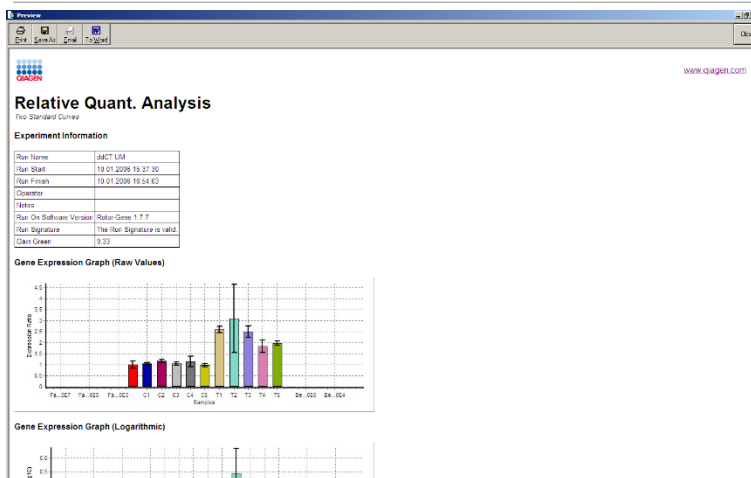
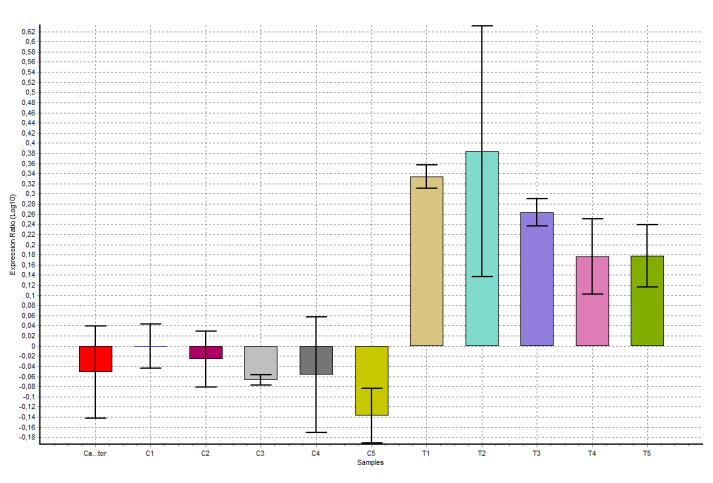
Completate le selezioni, le opzioni saranno contrassegnate da un segno di spunta come mostrato sotto.



4. Fare clic sul pulsante Reports (Report) per visualizzare la finestra Report Browser (Browser dei report). Selezionare dall'elenco l'analisi con il nome corretto. Fare clic sul pulsante Show (Mostra) per visualizzare il relativo report di quantificazione. L'opzione Export (Esporta) esporta i risultati in un nuovo foglio di calcolo 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 di 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 (Min rel) e Rel Max (Rel max) vengono generati calcolando la deviazione standard del quoziente delle deviazioni standard del GOI e del normalizzatore utilizzando la formula seguente:

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

dove:

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{stddev}{meanvalue}$$

6.6.4 Quantificazione relativa delta delta C_T

Il metodo delta delta CT 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 template aggiunta in base al confronto con il gene normalizzante. Questi valori normalizzati sono ulteriormente normalizzati relativamente a un trattamento con calibratore. Il calibratore potrebbe essere, ad esempio, un controllo non trattato wild-type o campioni al tempo zero.

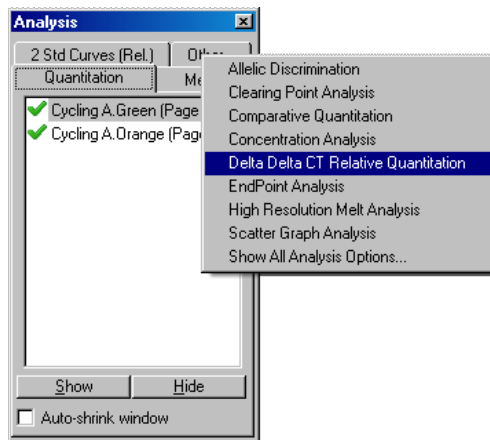
È essenziale che l'efficienza di amplificazione sia identica per il gene di interesse e per il gene normalizzante e che questo sia convalidato secondo le linee guida di Livak e Schmittgen.

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

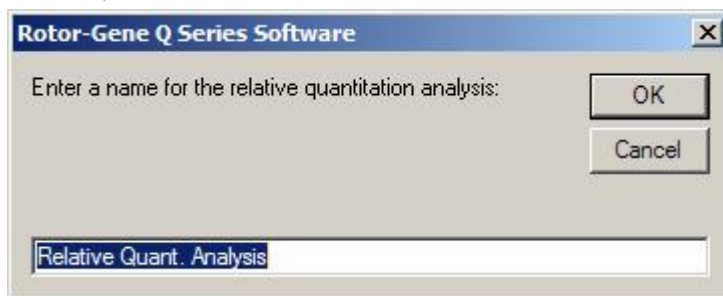
1. Analizzare i dati mediante "Quantificazione". Una volta eseguita la convalida, non è necessario trovare una curva standard.

Dalla scheda Other (Altro) della finestra Analysis (Analisi), selezionare Delta Delta CT Relative Quantitation (Quantificazione relativa delta delta CT). Selezionare New Analysis (Nuova analisi).

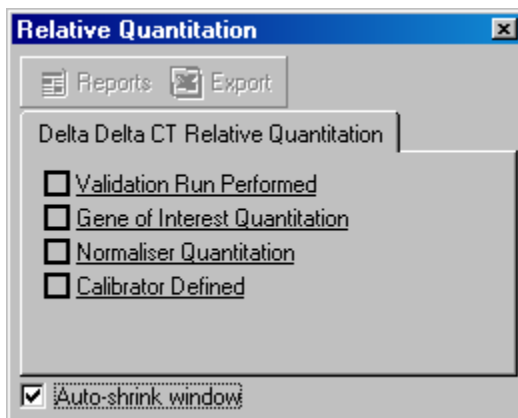
* Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402.

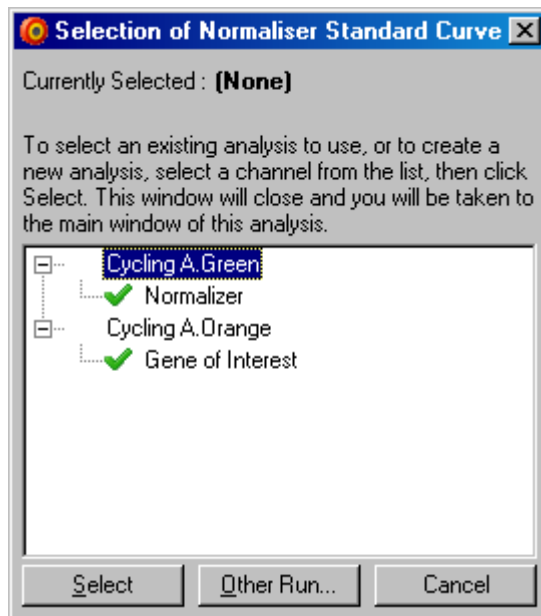


2. Immettere un nome per l'analisi.

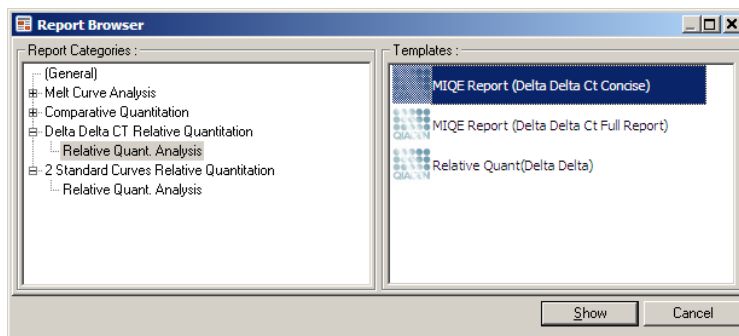


3. Per procedere con l'analisi, è necessario selezionare Validation Run Performed (Processo di convalida eseguito). Definire le pagine in cui sono stati analizzati il gene di interesse e il gene normalizzante.





4. Fare clic sul pulsante Reports (Report) per visualizzare la finestra Report Browser (Browser dei report). Selezionare dall'elenco l'analisi con il nome corretto. Fare clic sul pulsante Show (Mostra) per visualizzare il relativo report di quantificazione. L'opzione Export (Esporta) esporta i risultati in un nuovo foglio di calcolo 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. Vengono visualizzati i valori C_T per il gene di interesse ($GOI C_T$), i valori C_T per il gene di normalizzante ($Norm. C_T$), ΔC_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 (Min rel) e Rel Max (Max rel), fare riferimento a Litvak e Schmittgen (2001).*

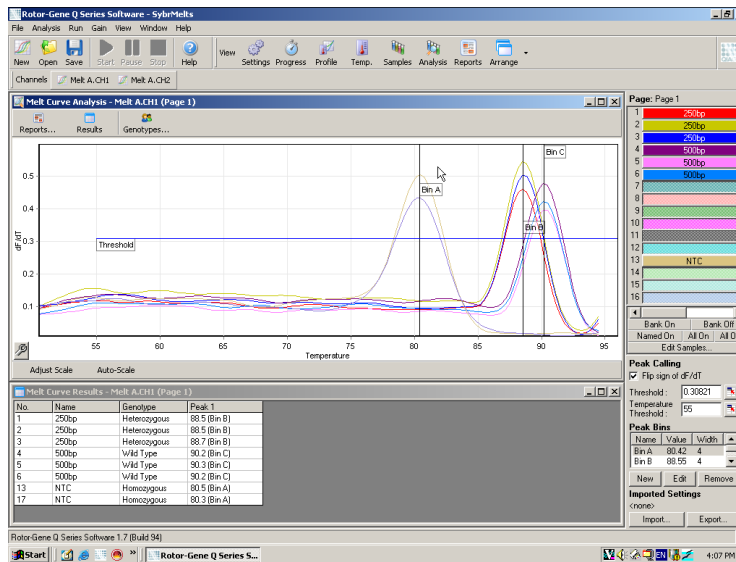
* Litvak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402.

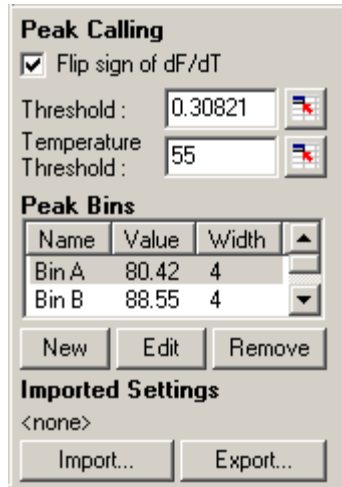
C	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta Delta CT	Relative Conc.	Rel Min	Rel Max	Calibrator
	Dilution 8		28.37						
	Dilution 7	37.61	28.39	9.22	4.40	0.04728	0.04128	0.05414	
	Dilution 6	35.72	28.28	7.44	2.62	0.16228	0.14904	0.17669	
	Dilution 5	35.04	28.24	6.80	1.98	0.25292	0.11715	0.54605	
	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	0.03957	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	208.45384	255.10870	

6.6.5 Analisi della curva di fusione

L'analisi della curva di fusione analizza la derivata dei dati grezzi dopo lo smoothing. Questa analisi di solito viene 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.





Flip sign of dF/dT (Alterna segno di dF/dT):

Prima di definire i picchi, accertarsi che il segno dF/dT sia corretto affinché il set di dati dia picchi positivi.

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 consiste nel nominare automaticamente tutti i picchi per ogni campione. L'altro, nell'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. Se necessario, i bin possono essere 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, fare clic sul pulsante New Bin (Nuovo bin), quindi fare clic sul grafico e tenerlo fermo per definire il centro del bin. Per aggiungere un altro bin, ripetere la procedura. Usare il pulsante Remove (Rimuovi) per cancellare i bin.

Threshold (Soglia):

Per impostare la soglia (asse y), fare clic sull'icona , quindi fare clic sul grafico e trascinare la linea di soglia sul livello desiderato.

Temperature Threshold (Soglia temperatura):

Per impostare una soglia di temperatura (asse x), fare clic sull'icona , quindi fare clic sul grafico e trascinare la linea di soglia a destra. In tal modo si elimina la soglia per le temperature più basse.

Nota: Questa operazione è utile in caso di rumore nel segnale alle basse temperature.

Report

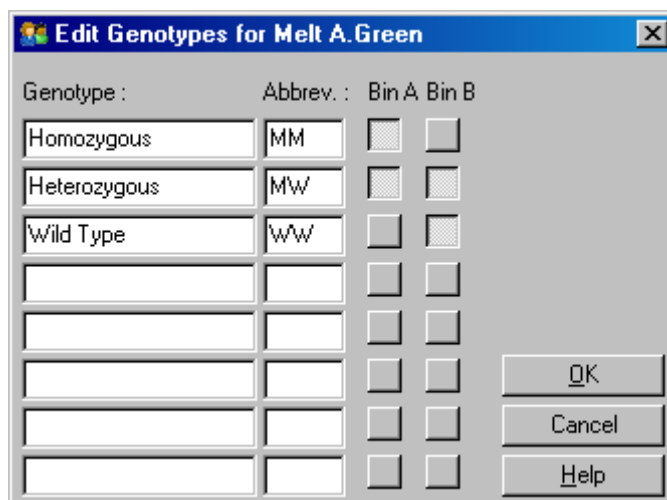
Aprire la finestra Report Browser (Browser dei report) nella quale si può generare l'anteprima di un report. È possibile generare un report sulla base del canale selezionato attualmente oppure si può generare un report di genotipizzazione multicanale.

Risultati

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

Genotipi

Fare clic su Genotypes... (Genotipi...) e selezionare i genotipi, come mostrato sotto.



Questa finestra permette di assegnare i genotipi all'incidenza dei picchi nei bin. La configurazione predefinita 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-type un picco nel secondo bin. È possibile immettere un'abbreviazione nel campo accanto al nome di ogni genotipo. Questa operazione 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, ad esempio, si esegue un'analisi FRET con colorante quencher 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 multiplex.

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 la sezione 7.1.



6.6.6 Quantificazione comparativa

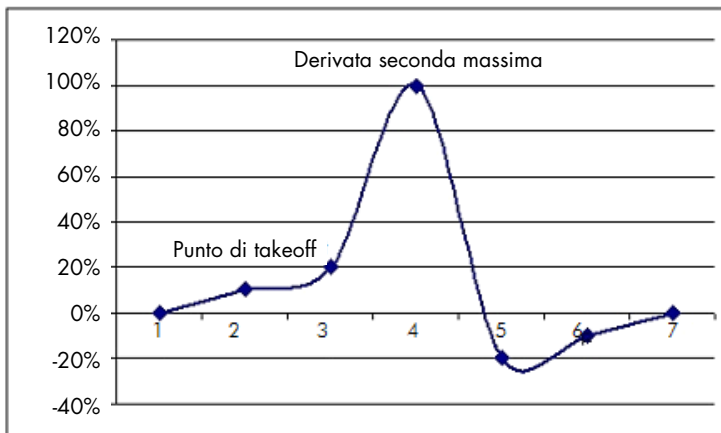
La quantificazione comparativa confronta l'espressione relativa dei campioni con un campione di controllo in un processo in cui non è disponibile una curva standard. Viene usata spesso nell'analisi con microarray. Warton e collaboratori (2004)* forniscono un esempio di questa tecnica.

1. Per eseguire l'analisi, selezionare Other (Altro) e poi Comparative quantitation (Quantificazione comparativa) nella finestra "Analysis (Analisi). 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 vengono calcolati automaticamente e visualizzati nella finestra Comparative Quantitation Results (Risultati della quantificazione comparativa) sotto il grafico.

Le prime colonne della finestra Comparative Quantitation Results (Risultati della quantificazione comparativa) riportano il numero e il nome del campione. La colonna Takeoff fornisce 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 derivata seconda è al 20% del livello massimo e indica la fine del rumore e la transizione alla fase esponenziale.

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

* 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.



La colonna "Amplification" (Amplificazione) fornisce l'efficienza del campione. Una reazione con efficienza al 100% genererebbe 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, ad 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 perché, 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.



Per calcolare l'espressione si usa l'amplificazione media. Ad 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." (Conc. Rep.) della finestra Comparative Quantitation Results (Risultati della quantificazione comparativa) 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 della 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 di 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 derivata seconda.
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 $\text{Amplification}^{(\text{Calibrator takeoff} - \text{Sample takeoff})}$ (Amplificazione^{takeoff calibratore - takeoff campione}).
7. Il risultato viene visualizzato nella notazione scientifica nella colonna "Rep. Conc." (Conc. rep.) della finestra Comparative Quantitation Results (Risultati della quantificazione comparativa).

6.6.7 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 (Altro), quindi Allelic Discrimination (Discriminazione allelica) nella finestra Analysis (Analisi). Eseguendo la discriminazione allelica, non è sufficiente fare doppio clic su un canale da analizzare, perché questa analisi usa più canali contemporaneamente. Per eseguire questa analisi, tenere premuto CTRL e fare clic per evidenziare tutti i canali che si desidera analizzare, oppure trascinare il puntatore su questi canali. Una volta evidenziati i canali desiderati, fare clic su Show (Mostra). L'elenco 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 rimuovere uno o più di questi canali, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'analisi e selezionare Remove Analysis... (Rimuovi analisi). 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 (Report): Apre il report della "Allelic Discrimination Analysis" (Analisi di discriminazione allelica) per un'anteprima.

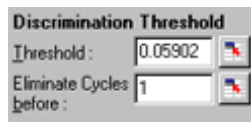
Results (risultati): Visualizza la finestra Allelic Discrimination Results (Risultati discriminazione allelica). Questa finestra si apre per impostazione predefinita quando l'analisi viene visualizzata per la prima volta.

Opzioni di normalizzazione: Sono disponibili varie opzioni per ottimizzare la normalizzazione dei dati grezzi:

- Dynamic Tube (Provetta dinamica) (normalizzazione con provetta dinamica)
- Slope Correct (Correzione pendenza) (correzione della pendenza del rumore)
- Ignore First x cycles (Ignora primi x cicli) (correzione per il rumore nei cicli iniziali)
- Takeoff point adjustment (Regolazione del punto di takeoff)

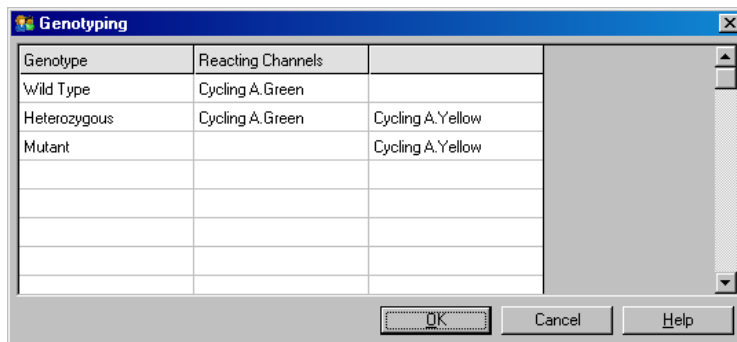
Per ulteriori informazioni, vedere pagina 92.

Discrimination Threshold (Soglia 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. Fare clic sull'icona a destra di ogni casella di testo, poi trascinare la soglia sul grafico per impostare visivamente questi valori.

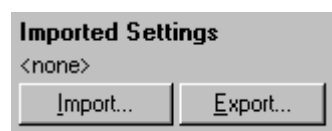


Genotypes (Genotipi): Questa funzione apre la finestra Genotyping (Genotipizzazione), che viene utilizzata per definire il genotipo rilevato in ciascun canale. Questa finestra permette di assegnare i genotipi ai canali per l'analisi della discriminazione allelica.

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



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 la sezione 7.1.



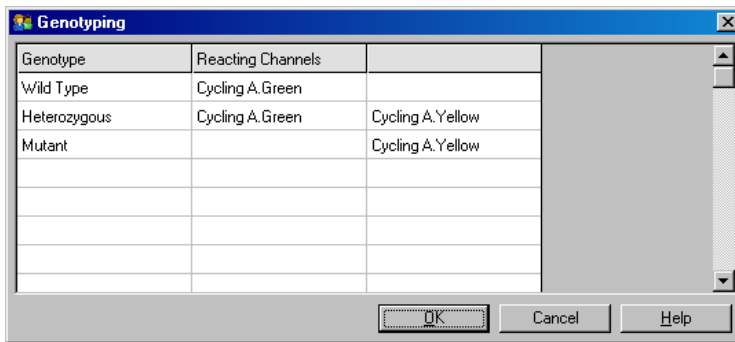
6.6.8 Analisi con grafico di dispersione

L'analisi con grafico di dispersione consente la genotipizzazione sulla base dell'espressione relativa dei grafici di amplificazione tra 2 canali. Diversamente dalla discriminazione allelica, il genotipo viene deciso sulla base delle regioni definite dal grafico di dispersione invece che da una soglia singola. Per eseguire l'analisi, selezionare **Other (Altro)**, quindi **Scatter Graph Analysis (Analisi con grafico di dispersione)** nella finestra **Analysis (Analisi)**.

Quando si esegue l'analisi con grafico di dispersione, non è sufficiente fare doppio clic su un canale da analizzare, perché questa analisi viene eseguita utilizzando 2 canali contemporaneamente. Per eseguire questa analisi, tenere premuto **SHIFT** e fare clic per evidenziare tutti i canali da analizzare oppure trascinare il puntatore su questi canali. Una volta evidenziati i canali desiderati, fare clic su **Show (Mostra)**.

L'elenco 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 rimuovere uno o più di questi canali, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'analisi e selezionare **Remove Analysis... (Rimuovi analisi...)**. Questi canali poi potranno essere inclusi in un'altra analisi con grafico di dispersione. Si può usare un canale soltanto in un'analisi per volta.

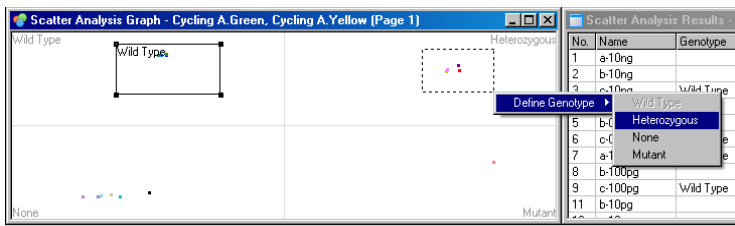
Reports (Report):	Apri il report Scatter Analysis (Analisi con dispersione) per un'anteprima.
Results (Risultati):	Visualizza la finestra Scatter Analysis Results (Risultati dell'analisi con dispersione) . Questa finestra si apre per impostazione predefinita quando l'analisi viene visualizzata per la prima volta.
Opzioni di normalizzazione:	Sono disponibili varie opzioni per ottimizzare la normalizzazione dei dati grezzi: <ul style="list-style-type: none">• Dynamic Tube (Provetta dinamica) (normalizzazione con provetta dinamica)• Slope Correct (Correzione pendenza) (correzione della pendenza del rumore)• Ignore First x cycles (Ignora primi x cicli) (correzione per il rumore nei cicli iniziali)• Takeoff point adjustment (Regolazione del punto di takeoff) Per ulteriori informazioni, vedere pagina 92.
Genotypes (Genotipi):	Questa funzione apre la finestra Genotyping (Genotipizzazione) che viene utilizzata per definire il genotipo 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 del grafico di dispersione e guideranno l'utente all'area generale del grafico di dispersione in cui si devono definire le regioni.



Scatter Graph (Grafico di dispersione):

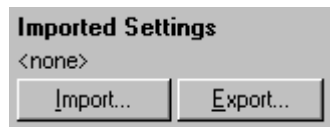
Il grafico di dispersione visualizza l'espressione relativa dei 2 canali selezionati. La visualizzazione viene normalizzata per tenere conto dei differenti incrementi per moltiplicazione in ogni canale e dei logaritmi trasformati per accentuare le differenze di espressione tra i campioni.

Per eseguire la genotipizzazione, l'utente definisce le regioni facendo clic su una selezione sul grafico e trascinandola. La selezione può essere poi etichettata in base ai genotipi configurati nella finestra Genotyping (Genotipizzazione).



Scatter graph analysis templates (Modelli di analisi con grafico di dispersione):

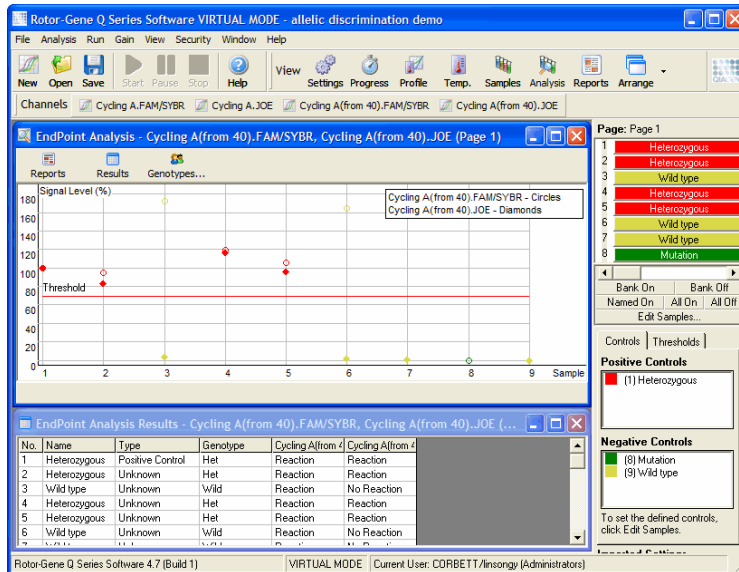
I modelli di analisi con grafico di dispersione permettono di esportare impostazioni di genotipo e regione in un unico file *.sct. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere la sezione 7.1.



6.6.9 Analisi EndPoint

L'analisi EndPoint consente la discriminazione tra campioni amplificati e non alla fine di un processo. I risultati sono qualitativi (positivo/negativo), non quantitativi.

L'analisi EndPoint è mostrata nella schermata sottostante.



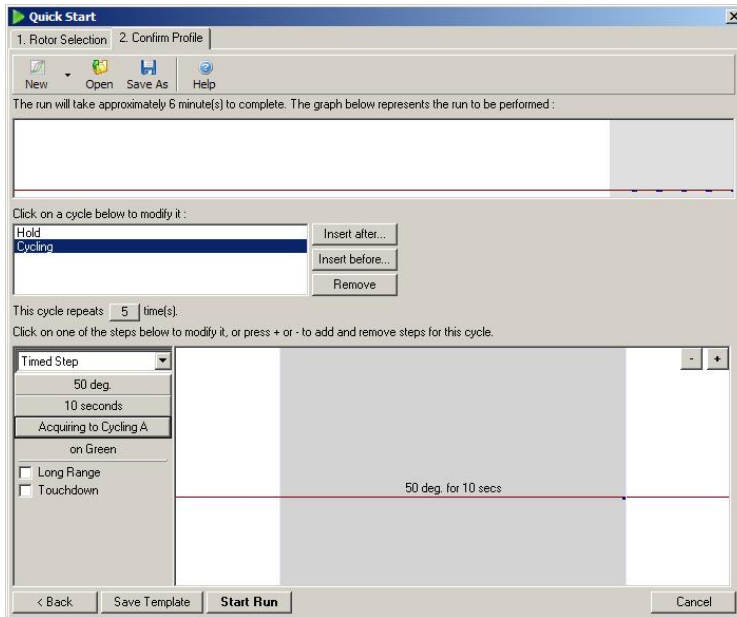
L'analisi EndPoint è simile alla discriminazione allelica, in quanto i risultati sono qualitativi e si possono assegnare dei nomi a certe permutazioni delle reazioni tra vari canali. Nell'analisi EndPoint, tuttavia, è disponibile un solo valore, contrariamente alla discriminazione allelica che utilizza 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.

- Controllo positivo: È un campione di cui è nota la capacità di amplificazione.
- Controllo negativo: È un campione di cui è nota l'incapacità di amplificazione. Questo rappresenta il tipico segnale di fondo.
- Soglia: La soglia è un livello di segnale al disopra del quale si dice che un campione è positivo (amplificato). Questa impostazione deve essere regolata dall'utente per ogni processo.
- 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%.
- Genotipo: Un'interpretazione di differenti permutazioni delle reazioni su canali diversi. Ad esempio, non si è potuto assegnare il genotipo "eterozigote" ai campioni che hanno reagito in entrambi i canali verde e giallo. Il genotipo può essere usato anche per riportare i risultati delle reazioni con i controlli interni. Ad esempio, i risultati possono essere riportati come "inibito", "positivo" o "negativo" a seconda che una reazione sia stata rilevata o meno 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 s) 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 l'applicazione particolare 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 di solito sono sufficienti.

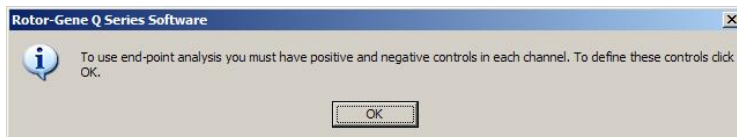
Analisi

L'analisi EndPoint può essere eseguita su vari canali contemporaneamente. Per creare una nuova analisi, fare clic sulla scheda EndPoint, selezionare i canali trascinandovi sopra il puntatore del mouse e fare clic su Show (Mostra).



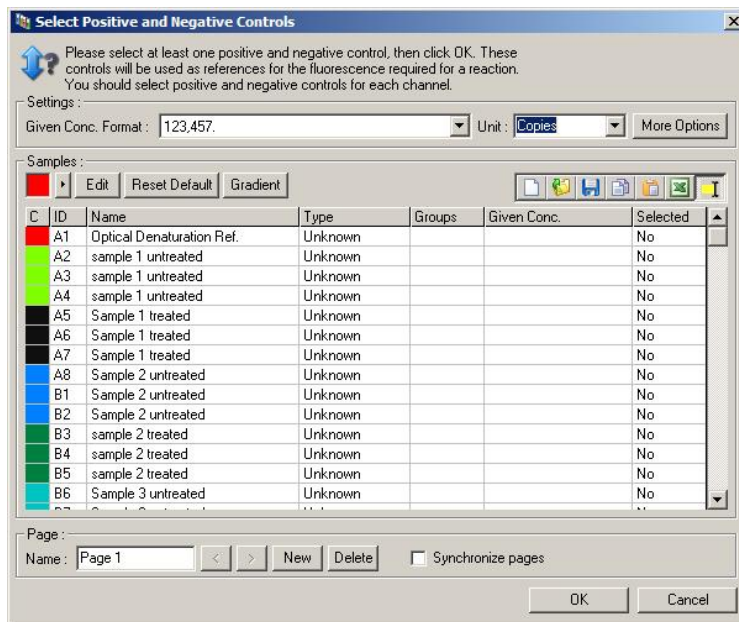
Definizione dei controlli

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 (Modifica campioni), che permette di definire i controlli positivi e negativi. Per definire un campione come controllo positivo o negativo, fare clic sulla cella del tipo di campione, quindi selezionare il tipo di controllo relativo dal menu a tendina.

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



Questa schermata funziona nello stesso modo della finestra Edit Samples (Modifica campioni) (vedere la sezione "Preparazione del campione").

Normalizzazione

La normalizzazione dei dati dell'analisi EndPoint ridimensiona tutti i livelli dei segnali entro il range 0–100%. È necessario selezionare almeno un controllo positivo e uno negativo, o più di uno se si analizzano canali multipli e gli standard non sono multiplex. Nel caso in cui sussista il rischio che un controllo positivo possa non amplificarsi, è necessario più di un controllo positivo e uno negativo.

1. Per ogni canale sono analizzati tutti i controlli positivi; 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. Vengono analizzati tutti i controlli negativi, 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.

Ad esempio:

Campione	Tipo	Fluorescenza
1	Controllo positivo	53,6
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 i 2 controlli positivi e i 2 negativi sono vicini tra loro e sono al di fuori dei valori di fluorescenza dei campioni.

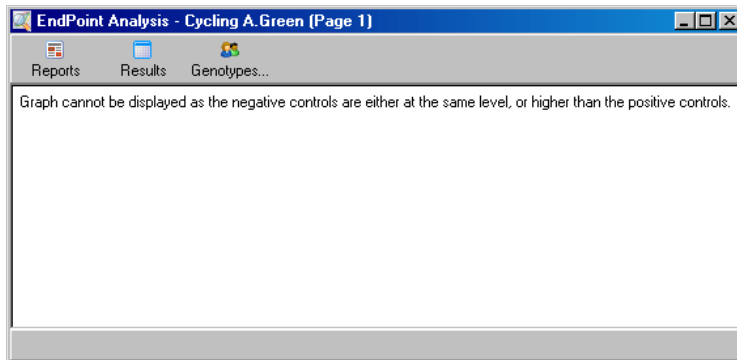
I valori normalizzati sono:

Campione	Tipo	Espressione (%)
1	Controllo positivo	100,0
2	Controllo positivo	97,3
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 probabilmente amplificato, mentre il campione 6 probabilmente non si è amplificato.

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 rispetto 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 multiplex, pertanto ogni provetta può avere solo una 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 (Modifica campioni) 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" (Tipo) della finestra Edit Samples (Modifica campioni). Altrimenti, il tipo deve essere Sample (Campione). Questo vale anche per i controlli negativi.

Ad 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. Poiché 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.

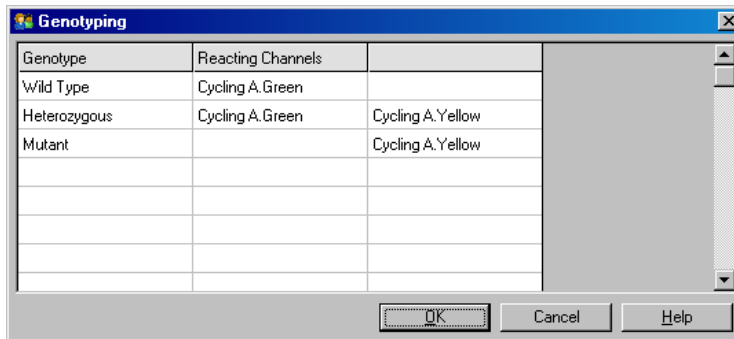
Soglia

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 è necessaria una sola soglia, anche se si analizzano più canali.

Fare clic 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, perché 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 (Genotipizzazione), 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

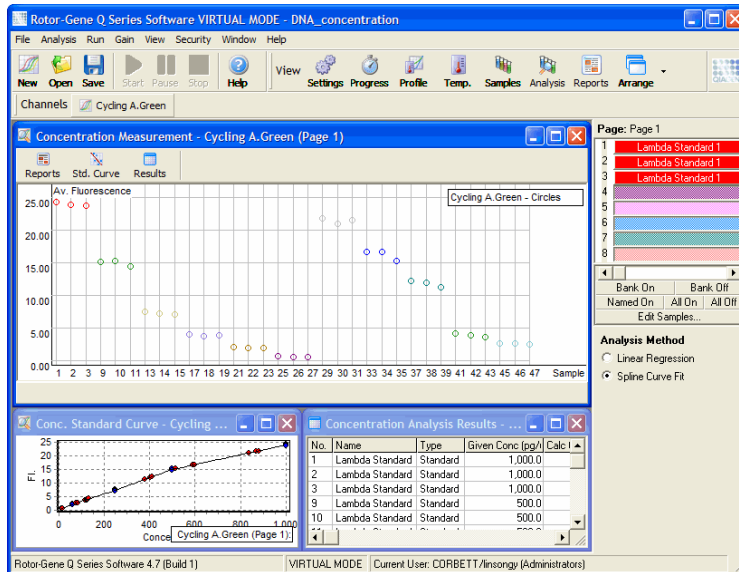
I modelli di analisi EndPoint permettono all'utente di esportare impostazioni di genotipo e di soglia in un unico file *.ent. Questo file può essere importato e riapplicato in altri esperimenti. Per ulteriori informazioni, vedere la sezione 8.1.



6.6.10 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 di fluorescenza, possibilmente in triplicato.

Preparazione degli standard

Per determinare la concentrazione del DNA per ogni campione misurato viene utilizzata una curva standard.

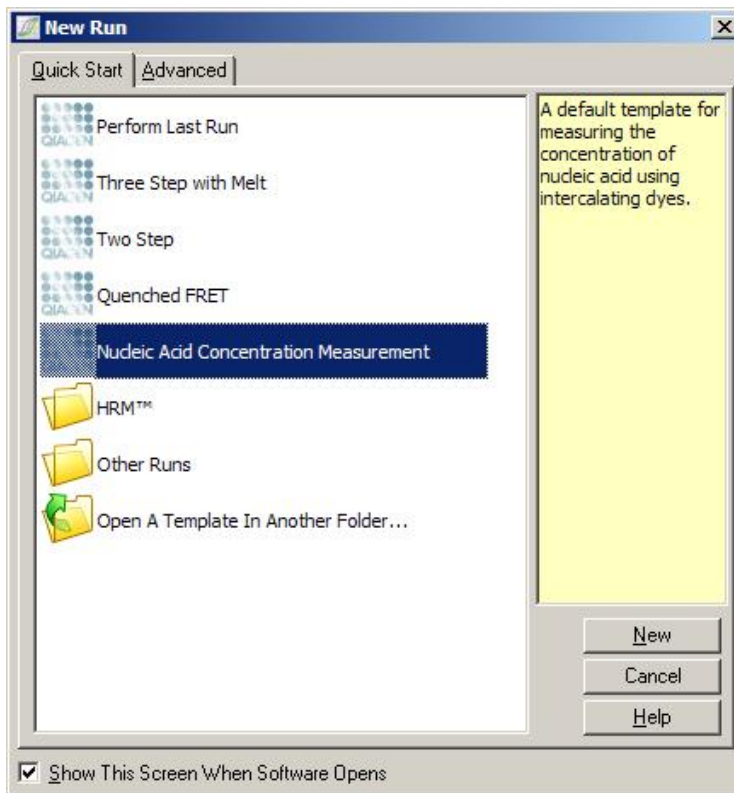
Il DNA usato per la curva standard dovrebbe essere di tipo simile a quello usato nei campioni misurati. Determinare la concentrazione di almeno un campione di DNA con spettrofotometria UV, in quanto questo campione deve essere usato come standard. Utilizzare un minimo di 3 standard (con replicati). È 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 della sostanza chimica.

Tipo di DNA misurato

Si sono osservate differenze nella misurazione di varie forme di DNA (ad esempio, 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 acidi nucleici) dalla procedura guidata Quick Start (Avvio Rapido).



Nota: accertarsi che nella posizione provetta 1 sia analizzato un controllo positivo, ad esempio, 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 dalla sostanza chimica e dall'applicazione.

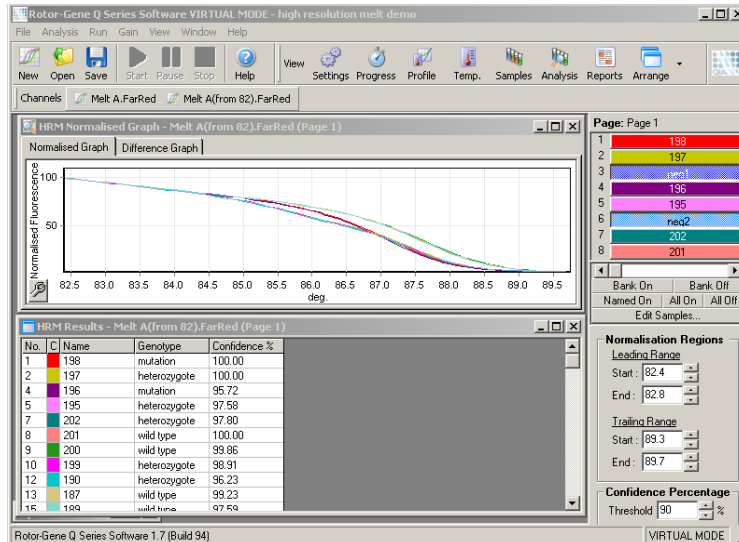
"Linear Regression" (Regressione lineare) analizza i dati ipotizzando un rapporto lineare e stimando i valori ignoti sulla base di un modello lineare generato. Determina l'errore di misurazione esaminando la deviazione dei valori da un modello lineare. Se i valori della concentrazione sono lineari, questa 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.

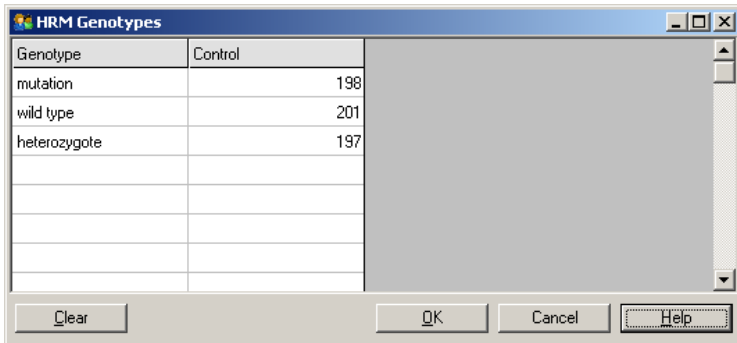
6.6.11 Analisi di fusione ad alta risoluzione

L'analisi di fusione ad alta risoluzione (HRM) caratterizza i campioni in base alla lunghezza della sequenza, al tenore di GC e alla complementarità. L'analisi HRM viene utilizzata nelle applicazioni per genotipizzazione, quali l'analisi delle mutazioni genetiche o dei polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, 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 sonde ed etichette rispetto ad altri metodi.

Per eseguire l'analisi, selezionare Other (Altro), quindi High Resolution Melt Analysis (Analisi di fusione ad alta risoluzione) nella finestra Analysis (Analisi). Fare doppio clic sul canale da 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 tra i punti finali di ogni campione con la media.



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



Per ulteriori informazioni sull'analisi HRM, vedere la sezione 10.

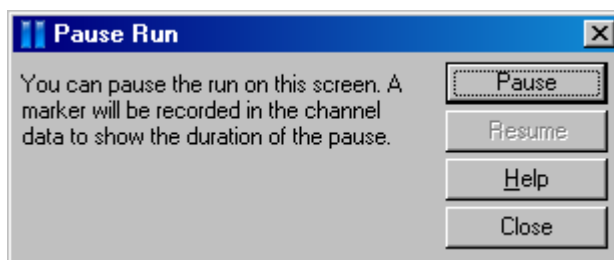
6.7 Menu di processo


6.7.1 Avvia processo

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 processo profilo). Viene visualizzata una rappresentazione grafica del profilo termico insieme alle impostazioni del gain per ogni canale.

6.7.2 Sospendi processo

Questa opzione consente di mettere in pausa e riprendere un processo. La pausa e la ripresa possono influire seriamente sui risultati di un processo. Per questo motivo, un contrassegno nei dati indicherà la sospensione del processo e la lunghezza della pausa. Viene anche inserito un messaggio nella scheda dei messaggi della finestra Run Settings (Impostazioni processo) (vedere la sezione 6.8.1).



AVVERTENZA 	<p>Superficie bollente</p> <p>Quando si mette in pausa un processo, il Rotor-Gene Q MDx non si raffredda completamente fino alla temperatura ambiente. Usare cautela prima di maneggiare il rotore o le provette nello strumento.</p>
--	--

6.7.3 Arresta processo

Se è stata selezionata questa opzione, compare la richiesta di confermare la necessità di arrestare il processo.

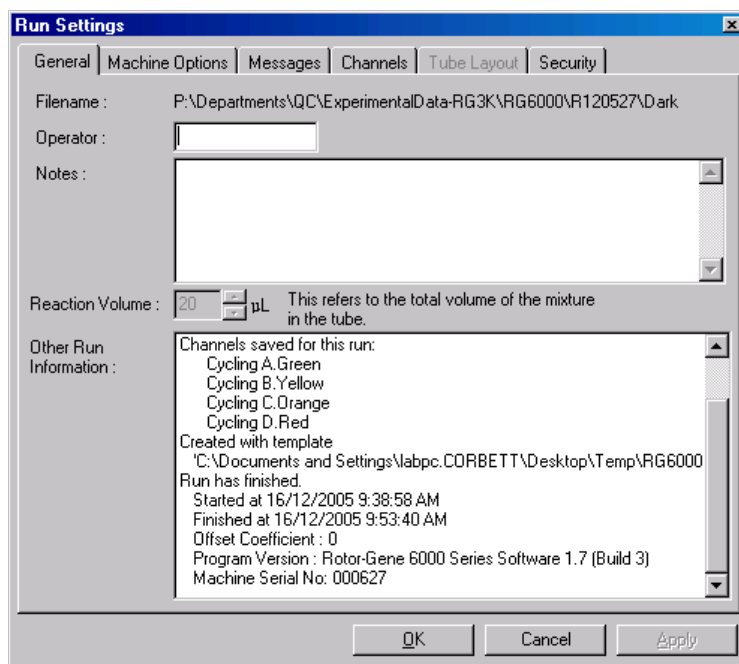
6.8 Menu Visualizza

6.8.1 Impostazioni processo

Generale

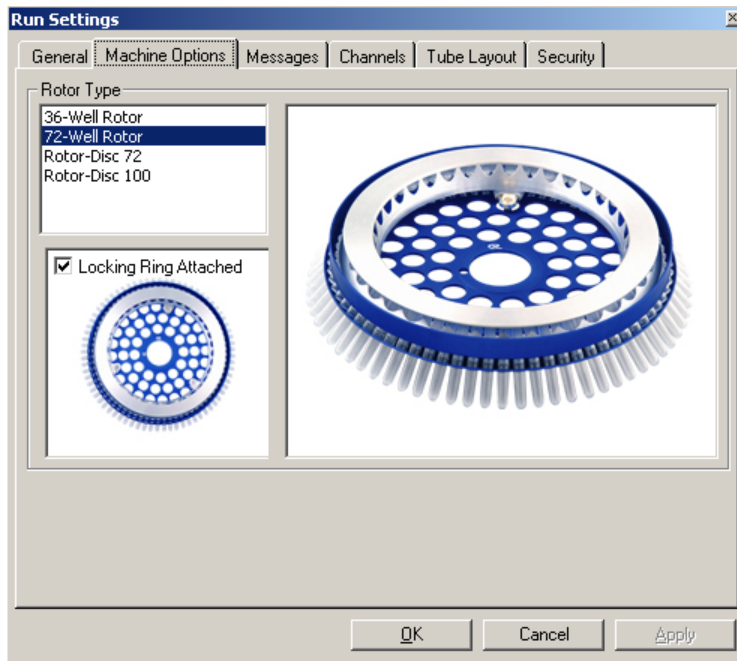
Questa finestra permette di impostare informazioni del processo, nome del file, data dell'analisi, operatore ed eventuali note associate.

La finestra contiene tutte le informazioni occorrenti per configurare il processo, fatta eccezione per 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 mostra le impostazioni di configurazione del Rotor-Gene Q MDx.



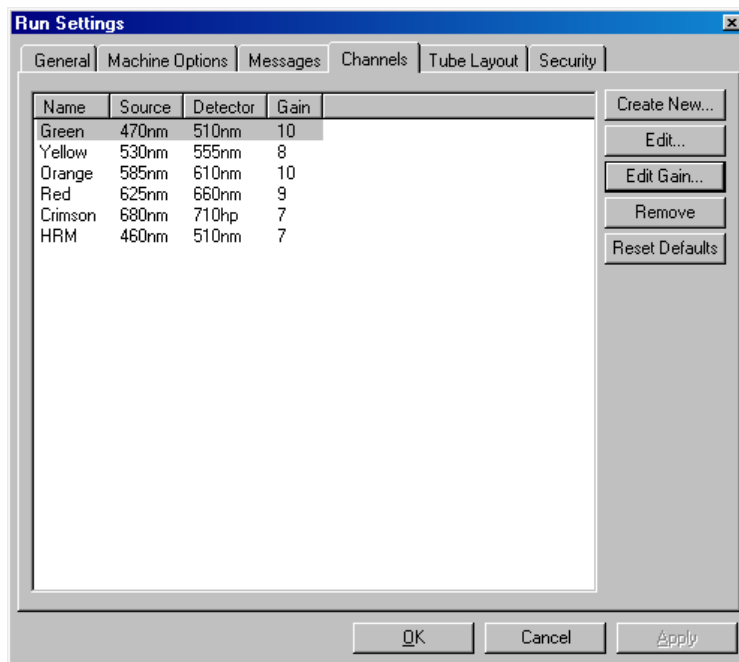
Il rotore deve essere impostato su quello attualmente installato sul Rotor-Gene Q MDx. Se si apre un processo esistente, questa impostazione rifletterà il rotore che era installato allora nel termociclizzatore.

Messaggi

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

Canali

Se si sta configurando un nuovo processo, la scheda dei 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 predefiniti facendo clic su Reset Defaults (Ripristina predefiniti).



- 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... (Crea nuovo...): Questa funzione permette di creare nuovi canali. Facendo clic su Create New... (Crea nuovo...) si visualizza una finestra che richiede nuovo nome, origine e filtro di sensibilità. I filtri possono essere scelti dal menu a tendina accanto a ciascuna finestra.
- Channels (Canali): I canali verde, giallo, arancione e rosso sono la configurazione standard per il rilevamento in multiplex a 4 canali.

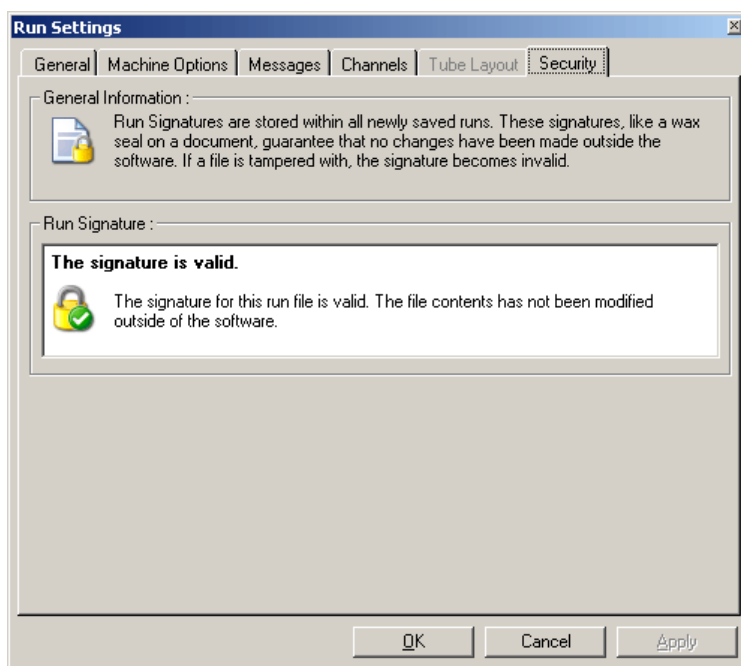
Disposizione provette

Se si usa un 72-Well Rotor, i campioni possono essere disposti in modo da riprodurre fedelmente l'etichettatura di un blocco 9 x 8. Per impostazione predefinita, la scheda del layout provette permette di etichettare i campioni in sequenza (ovvero 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

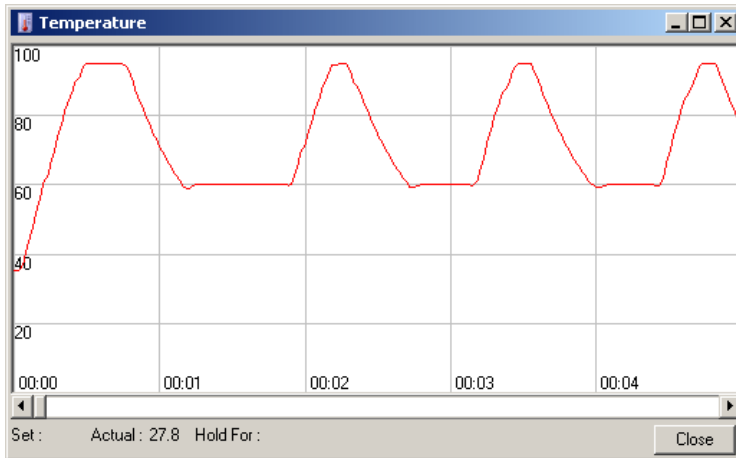
La scheda relativa alla sicurezza visualizza informazioni sulla firma del processo. La firma del processo è un codice irreversibile rigenerato ogni volta che si modifica il file. Se una qualsiasi sezione del file *.rex viene modificata al di fuori del software, la firma e il file non corrispondono più. 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 i file *.rex vengono inviati per e-mail, il processo di criptazione può invalidare la firma. Per evitarlo, comprimere il file prima di spedirlo per e-mail.



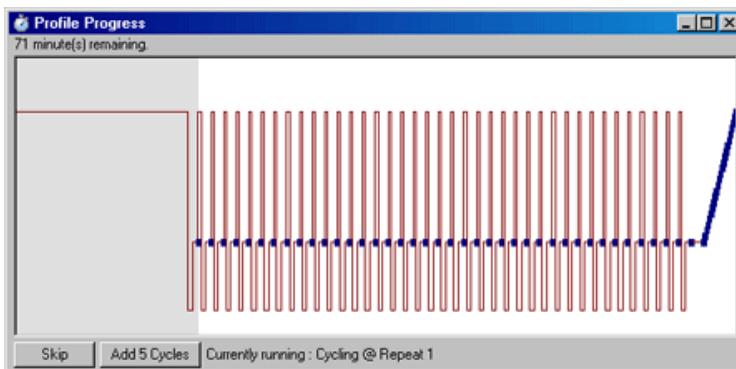
6.8.2 Grafico temperatura

Selezionare Temperature Graph (Grafico temperatura) dal menu View (Visualizza) oppure fare clic 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 (Mantieni) per ogni fase del programma. Per un file di processo esistente, la finestra Temperature (Temperatura) 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 (Temperatura).



6.8.3 Progresso del profilo

Selezionare Profile Progress (Progresso del profilo) dal menu View (Visualizza) o fare clic sul pulsante Progress (Progresso) per visualizzare la finestra Profile Progress (Progresso del profilo). 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.



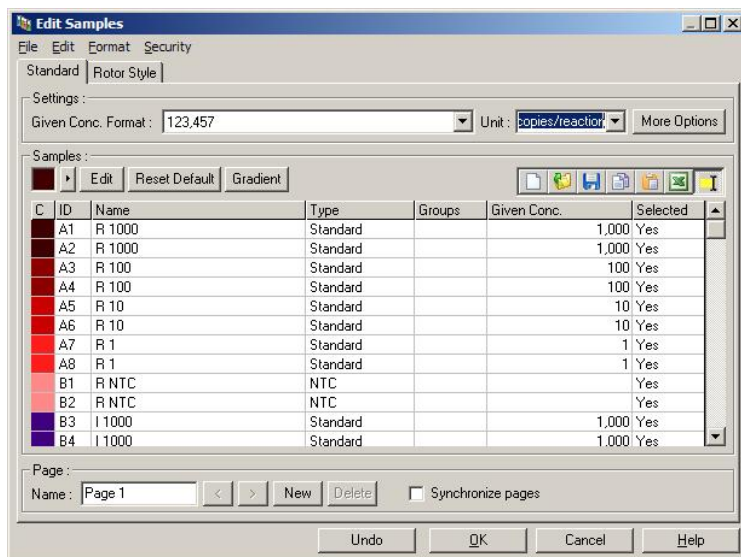
Skip (Salta):

Skip (Salta) permette di saltare qualsiasi fase del profilo.

Add 5 Cycles (Aggiungi 5 cicli):

Add 5 Cycles (Aggiungi 5 cicli) aggiunge 5 ripetizioni alla fase di ciclo corrente.

6.8.4 Modifica campioni



Fare clic sul pulsante Samples (Campioni) per visualizzare la finestra Edit Samples (Modifica campioni). La finestra Edit Samples (Modifica campioni) è accessibile anche facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'elenco dei campioni sulla destra dello schermo. La finestra ha funzioni identiche a quelle della finestra Edit Samples (Modifica campioni) delle procedure guidate, tranne per il fatto che le funzioni della barra degli strumenti sono disponibili anche nei menu File ed Edit (Modifica).

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

Nota: se i nomi dei campioni vengono immessi molto rapidamente durante il processo (ad esempio, utilizzando uno scanner per codici a barre) è possibile che le lettere al loro interno vengano invertite. Pertanto, è consigliabile evitare di utilizzare uno scanner per codici a barre e, se applicabile, immettere i nomi dei campioni una volta completato il processo.



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



Questo menu a tendina stabilisce le unità di misura per l'esame.



Pulsante**Importanza**

Line style (Stile linea):

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 freccia verso destra accanto al pulsante Edit (Modifica).



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



Fare clic su Reset Default (Reimposta predefinite) per riportare tutte le celle colorate selezionate ai valori cromatici predefiniti.



Gradient (Gradiente) consente di scegliere un gradiente dal primo colore selezionato all'ultimo. In un setup del campione si possono definire vari gradienti.



L'icona New (Nuovo) cancella tutte le voci della finestra Edit Samples (Modifica campioni) in preparazione all'immissione dei dati.



L'icona Open (Apri) visualizza una finestra di dialogo da cui è possibile scegliere un file del Rotor-Gene Q MDx da importare.

Nota: il numero dei campioni nella finestra aperta deve corrispondere a quello nel file che viene importato.



L'icona Save (Salva) visualizza 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) copia le celle selezionate.



L'icona Paste (Incolla) 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 file e la cartella in cui salvare le informazioni sul campione. Dopo aver premuto Save (Salva), il file Excel si apre automaticamente.



L'icona Append/Overwrite (Inserimento/Sovrascrittura) cambia la modalità di modifica delle celle nella finestra Edit Samples (Modifica campioni). 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):

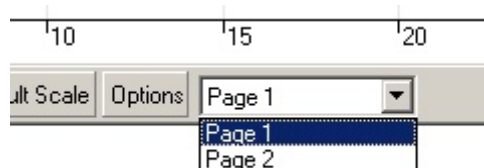
I campioni possono essere definiti come uno dei vari tipi elencati nella tabella seguente,

Tipo di campione	Descrizione
None (Nessuno)	Nessun campione in quella posizione
NTC	Controllo senza template
Negative Control (Controllo negativo)	Controllo negativo
Positive Control (Controllo positivo)	Controllo positivo
Unknown (Sconosciuto)	Campione sconosciuto da analizzare
Standard	Si utilizzano i valori standard per costruire una curva standard per calcolare le concentrazioni di campioni sconosciuti
Calibrator (RQ) (Calibratore (RQ))	A un calibratore viene assegnato un valore di 1 e tutte le altre concentrazioni del campione sono calcolate rispetto a questo campione

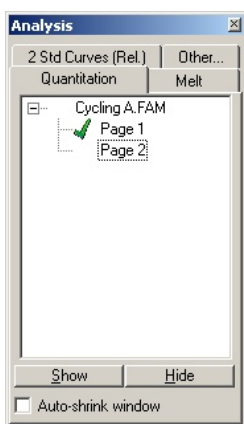
Page (Pagina):

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 diversi. Utilizzare i pulsanti freccia per spostarsi tra le pagine dei campioni. Usare i pulsanti New (Nuovo) e Delete (Elimina) per creare ed eliminare pagine. È possibile avere definizioni multiple del campione per lo stesso canale, per ottenere curve standard multiple senza multiplex. È sufficiente definire i campioni di interesse e le relative curve standard su pagine separate. Il singolo canale può così essere analizzato indipendentemente con ciascuna serie di definizioni. Le pagine del campione possono essere etichettate Page 1 (Pagina 1), Page 2 (Pagina 2) e così via oppure possono essere denominate a piacere (ad esempio, "Housekeeper"). Questo sarà il nome che compare nei 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 (Opzioni):



La pagina campione da usare per eseguire un'analisi può essere selezionata nella finestra Analysis (Analisi) (vedere la sezione 6.6.1).



Given Conc.
(Concentrazione data):

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 successiva diluizione logica nella serie.

Line style (Stile linea):

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 freccia verso destra accanto al pulsante Edit (Modifica).



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



Multiple row entry
(Immissione file multipla):

Se le stesse informazioni devono essere immesse in varie file contemporaneamente, selezionare tutte le file, poi iniziare l'immissione. Le informazioni verranno inserite in ogni fila. Questa operazione funziona anche per la selezione dei tipi di campione, la scelta dei colori o l'immissione di concentrazioni.

Sample type hotkey (Tasto rapido tipo campione):

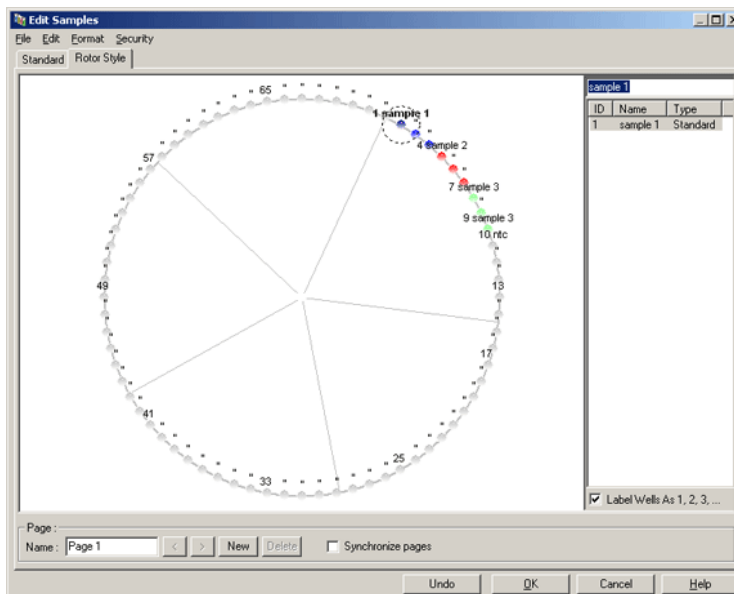
Per selezionare rapidamente un tipo di campione, immetterne la prima lettera del nome. Ad esempio, per impostare 5 campioni come controlli senza template, selezionarli nella colonna del tipo di campione, quindi premere N per NTC. Tutti i campioni saranno convertiti in NTC.

Save it, reuse it
(Salva, riutilizza):

Una descrizione completa del campione può essere salvata come file (*.smp) e caricata nei processi futuri con la stessa configurazione dal campione.

Stile del rotore

Questa scheda nella finestra Edit Samples (Modifica campioni) offre un modo alternativo di immettere il nome dei campioni. Selezionare i replicati facendo clic sul puntatore del mouse e trascinandolo sull'immagine del rotore. L'elenco sulla destra della finestra verrà aggiornato. Si può ora immettere il nome del campione, che sarà lo stesso nome per la selezione corrente. Il software riconosce questi pozzetti come replicati.

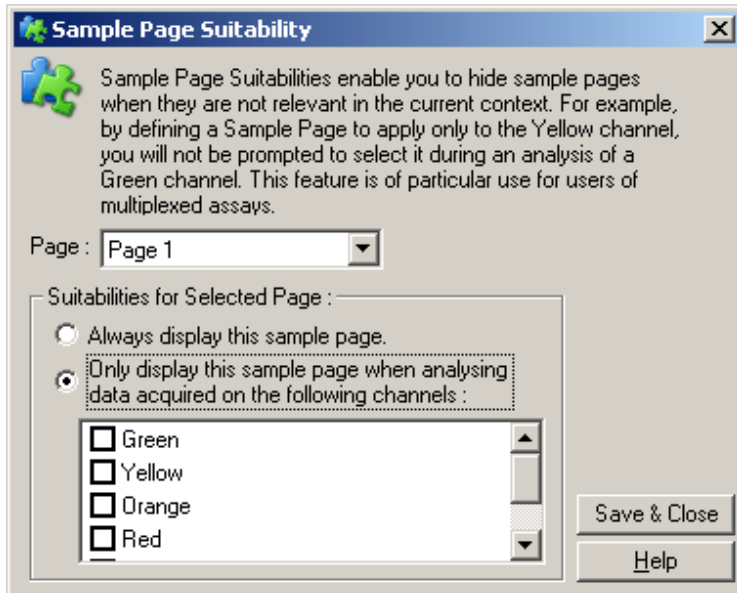


La scheda Rotor Style (Stile rotore) fornisce una versione ridotta della scheda Standard ed è destinata agli utenti che vogliono impostare rapidamente i nomi e i colori del campione. In questa scheda non è possibile definire alcune impostazioni, ad esempio se il campione rappresenta uno standard o la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

Idoneità della pagina campione

Per accedere alla finestra Sample Page Suitability (Idoneità della pagina campione), fare clic su su More Options (Altre opzioni) nella finestra Edit Samples (Modifica campioni) e poi fare clic su Define Suitabilities (Definire idoneità). La finestra Sample Page Suitability (Idoneità della pagina campione) permette all'utente di abbinare le pagine campione ai canali. Ad esempio, la pagina campione per il gene di 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 di analisi disponibili per includere solo quelle rilevanti per quel particolare esame.

La finestra Sample Page Suitability (Idoneità della pagina campione) viene mostrata sotto.

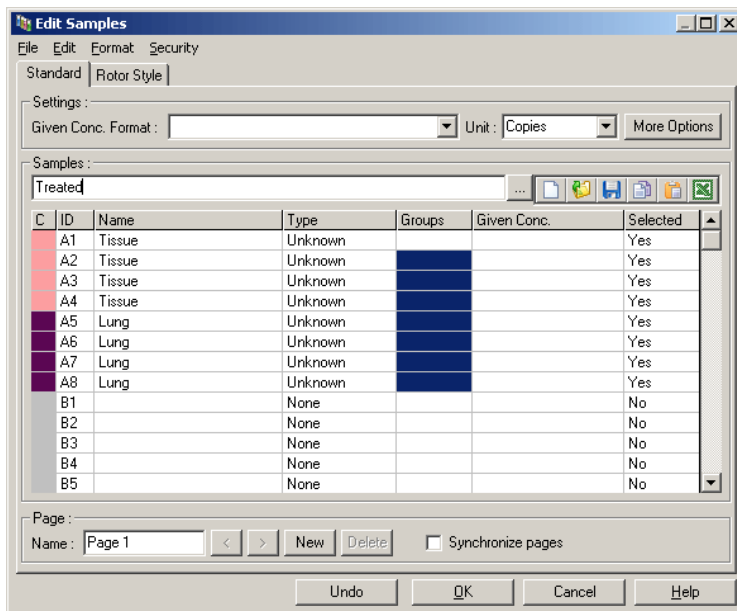


Nota: quando si imposta un esame, creare tutte le pagine campione e le relative idoneità, quindi salvarle come modello. In questo modo si riducono le operazioni di setup per ogni processo.

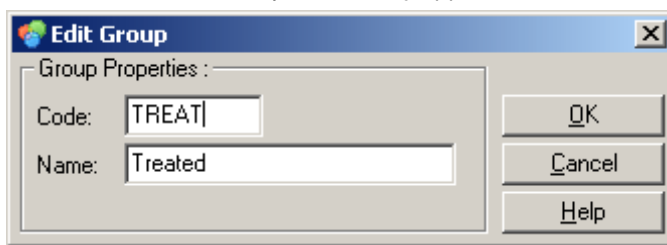
Gruppi

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 in qualsiasi punto del 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 (Invio).



2. Viene visualizzata la finestra Edit Group (Modifica gruppo).

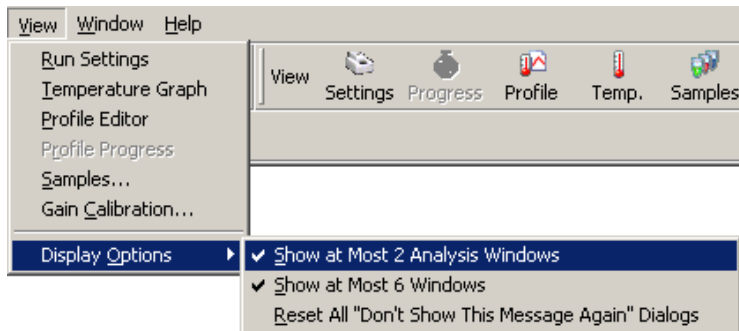


3. Definire un'abbreviazione idonea, quindi fare clic su OK. L'abbreviazione ora può essere utilizzata per impostare gruppi. I risultati raggruppati, quali valore medio e intervalli di confidenza del 95%, sono calcolati automaticamente per i gruppi in qualsiasi analisi.

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				18.75	0.17	[18.48, 19.02]	
A2	Tissue	Unknown	18.75							
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]	

6.8.5 Opzioni di visualizzazione

Il menu delle opzioni di visualizzazione è illustrato di seguito.



Show at Most 2 Analysis Windows (Mostra al massimo 2 finestre di analisi):

Se questa opzione è selezionata, vengono visualizzate al 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 Windows (Mostra al massimo 6 finestre):

Per migliorare la leggibilità, il software rimuove le finestre inutilizzate quando si aprono nuove finestre. Questa opzione è abilitata per impostazione predefinita, per mantenere sgombro lo schermo del software Rotor Gene Q. Rimuovere 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 (Ripristina tutte le finestre di dialogo: "Non mostrare di nuovo questo messaggio"):

Se è selezionata questa opzione, il software visualizzerà nuovamente tutte le finestre di dialogo in cui era stata selezionata la casella di controllo Do not display this message again (Non visualizzare di nuovo questo messaggio). Sono inclusi i messaggi riguardanti impostazioni sospette che in precedenza possono essere 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.

6.9 Protezione dell'accesso per il software Rotor-Gene Q

Nota: questo capitolo descrive la protezione dell'accesso per il software Rotor-Gene Q. Per informazioni relative al software Rotor-Gene AssayManager, vedere il *Manuale utente di Rotor-Gene AssayManager v1.0 Core Application* o il *Manuale utente di Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

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 mediante il modello di sicurezza integrato 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 revocare 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, è necessario disporre di Windows 10 o Windows 7 Professional Edition. Le funzioni di sicurezza non possono essere utilizzate con Windows 10 o Windows 7 Home Edition, poiché le Home Edition non dispongono del modello di accesso granulare utilizzato dal software. Il software deve essere installato con l'opzione Force authentication through Windows domain (Forzare l'autenticazione mediante il dominio Windows).

Nota: il menu Security (Sicurezza) non viene visualizzato se si è registrati in un dominio Linux Samba. Per utilizzare le funzioni di sicurezza, è necessario disporre di un accesso locale o di un server Windows.

6.9.1 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 (Forzare l'autenticazione mediante il dominio Windows). Questa richiede al dominio Windows il livello di accesso e le credenziali ed è essenziale per le funzioni di trasparenza e sicurezza.

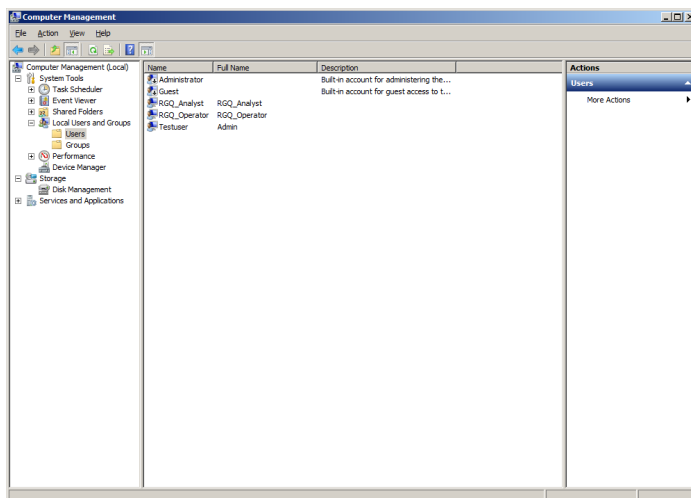
Gestione come amministratore

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/Control Panel/Administrative Tools/Computer Management (Start/Pannello di controllo/Strumenti di amministrazione/Gestione computer) e andare a Local Users and Groups (Utenti e gruppi locali) sul lato sinistro.
2. Nella finestra che viene visualizzata, selezionare la cartella Users (Utenti). Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla finestra di destra e selezionare New User (Nuovo utente).



3. Immettere il nome utente e la password. Per impostazione predefinita, 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 image shows a 'New User' dialog box with the following fields and options:

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

Buttons: Help, Create, Close

4. Fare clic su Create (Crea). Ora si può eseguire il login come questo utente.

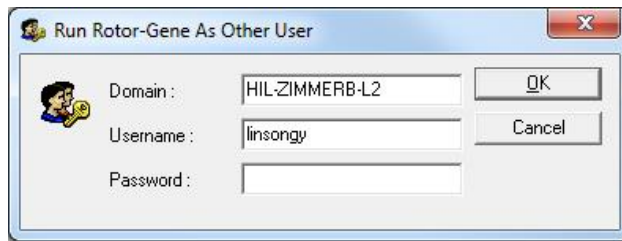
Assegnazione di ruoli a ogni utente

È il momento di assegnare ruoli a 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

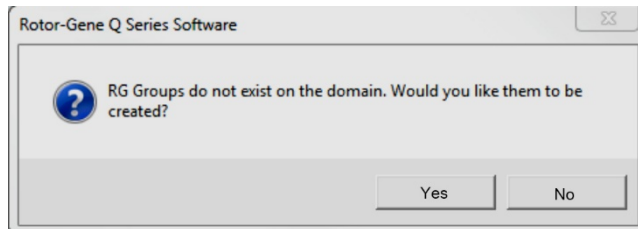
Per assegnare i ruoli:

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

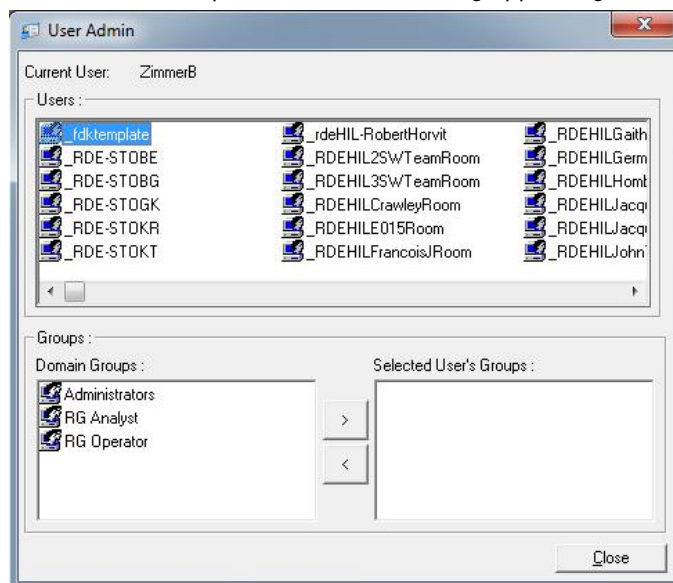


Nota: per creare i gruppi RG con il software Rotor-Gene Q, è necessario eseguire il software con i diritti di amministratore. A tal fine, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'icona desktop e scegliere Run as administrator (Esegui come amministratore) nel menu contestuale.

- Una volta aperto il software, fare clic sul menu Security (Sicurezza). La prima volta che si accede al Security (Sicurezza), il software Rotor-Gene Q configura diversi gruppi di sistema che controlleranno l'accesso al software.

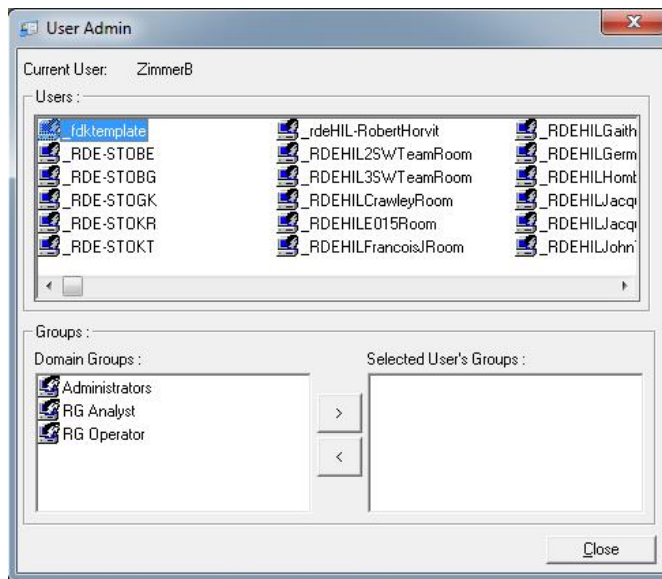


- Fare clic su Yes (Sì). Viene visualizzata la finestra User Admin (Amm. utenti). Nel pannello in alto sono visualizzati tutti gli utenti del computer. Alcuni account sono utilizzati dal sistema, pertanto non sono familiari. Il riquadro in basso mostra i gruppi assegnati all'utente.

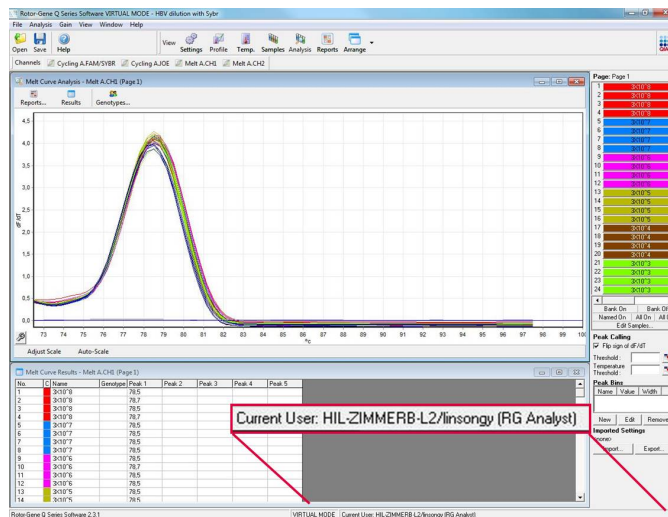


- Per assegnare un gruppo a un utente, selezionare il nome dell'utente dall'elenco. Il riquadro in basso verrà aggiornato. Se l'utente non ha nessun gruppo, non può avviare il software.

5. Nell'esempio sottostante, assegniamo l'utente linsongy al gruppo RG Analyst (Analista RG) selezionando il gruppo sul lato sinistro, quindi facendo clic sul pulsante >. I gruppi possono essere rimossi selezionandoli, quindi facendo clic sul pulsante <.

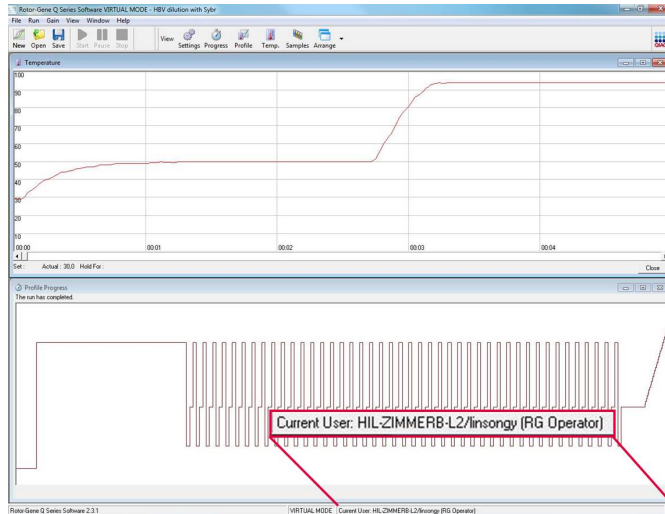


6. Eseguire ora il login come questo utente. In quanto RG Analyst (Analista RG), il menu Run (Esegui) e il pulsante Profile (Profilo) non sono disponibili. È invece possibile aprire e analizzare file esistenti, come mostrato nella schermata seguente. La barra di stato indica che l'utente linsongy è un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

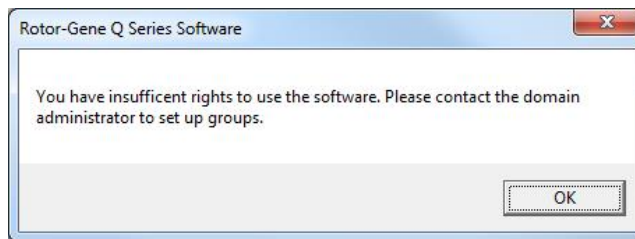


7. Eseguendo nuovamente il login come amministratore, si possono assegnare i diritti di RG Operator (Operatore RG) a linsongy ed è possibile rimuovere nuovamente i diritti di RG Analyst (Analista RG). Quindi, il software deve essere avviato di nuovo. Questa volta mancano il menu

Analysis (Analisi) e il pulsante Reports (Report), mentre è abilitato il menu Run (Esegui). La barra di stato indica che l'utente linsongy appartiene al gruppo RG Operator (Operatore RG).



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



6.9.2 Configurazione per Windows 10

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 (Forzare l'autenticazione mediante il dominio Windows). 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

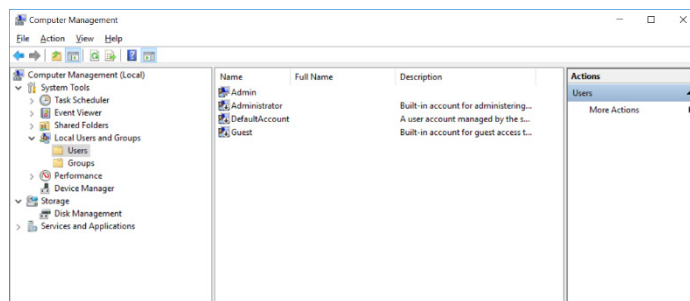
Molti utenti gestiscono il proprio computer come amministratori, senza password. Sebbene questo sia comodo, rende però impossibile determinare chi usi il computer. Questo elimina la trasparenza e impedisce l'attivazione di molte misure di sicurezza del software Rotor-Gene Q.

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, accedere a Computer Management (Gestione computer), premere Enter (Invio) e andare a Local Users and Groups (Utenti e gruppi locali) sul lato sinistro.
2. Nella finestra che viene visualizzata, selezionare la cartella Users (Utenti). Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla finestra di destra e selezionare New User... (Nuovo utente...).



3. Immettere il nome utente e la password. Per impostazione predefinita, gli utenti saranno creati con privilegi d'accesso normali. Questo significa che potranno usare il software, ma non installare nuovi programmi, né cambiare impostazioni del sistema.

4. Fare clic su Create (Crea). Ora si può eseguire il login come questo utente.

Assegnazione di ruoli a ogni utente

È il momento di assegnare ruoli a 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

Nota: in Microsoft Windows 10 non è possibile creare gruppi di utenti con il software Rotor-Gene Q. I gruppi devono essere creati nel dominio da un amministratore di dominio, che dovrà eseguire anche l'assegnazione degli utenti a un gruppo specifico. Il menu Run (Esegui) è abilitato. La barra di stato indica che l'utente linsongy appartiene al gruppo RG Operator (Operatore RG).

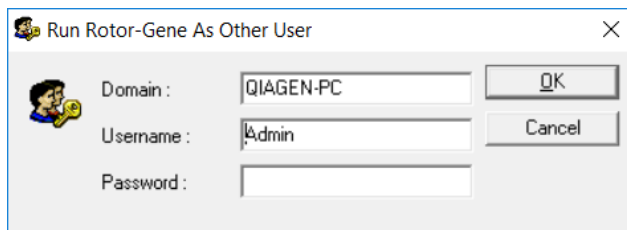
6.9.3 Gestione di più utenti sullo stesso computer

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 (Login al software Rotor-Gene Q) gli utenti possono aprire il loro account utente nel software Rotor-Gene Q.



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



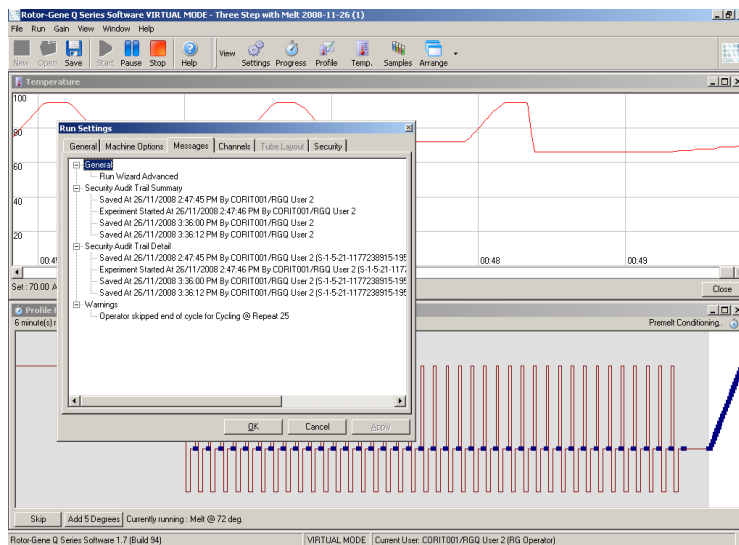
3. Il dominio è il computer a cui si sta accedendo o il nome della rete locale. Consultare il proprio amministratore di rete se non si è sicuri di quale dominio inserire in questo campo.

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.

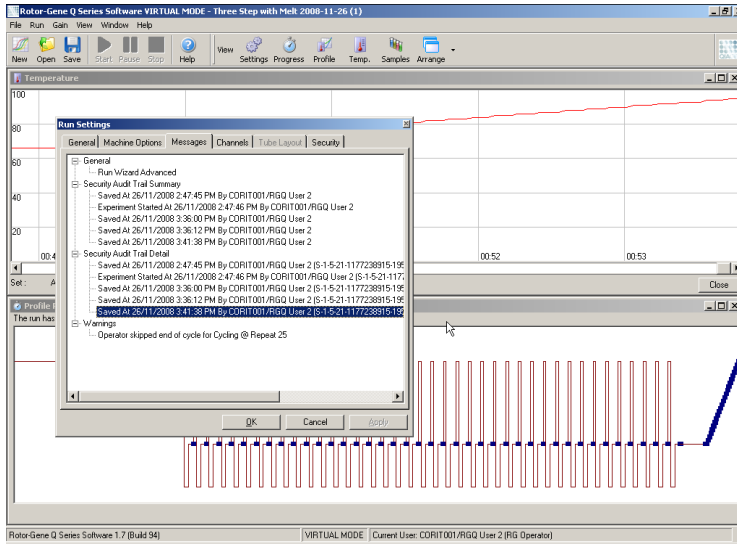
6.9.4 Registrazione delle operazioni effettuate

Ogni volta che un file è salvato da un utente, i dettagli relativi sono registrati in Run Settings (Impostazioni processo) sotto la scheda Messages (Messaggi) come Security Audit Trail Summary (Riepilogo registrazione delle operazioni effettuate per la sicurezza) e Security Audit Trail Detail (Dettaglio registrazione delle operazioni effettuate per la sicurezza).



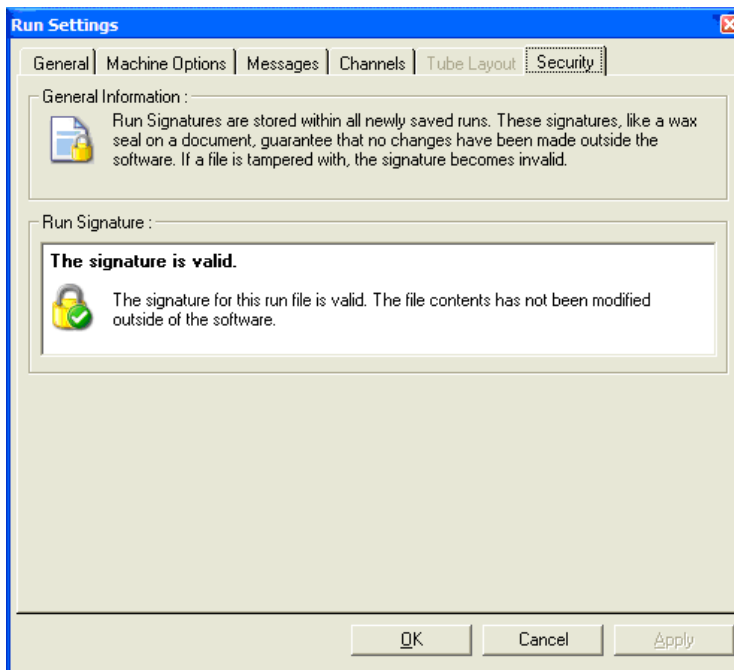
La funzione può essere usata per monitorare chi ha modificato il contenuto di un file. Security Audit Trail Detail (Dettaglio registrazione delle operazioni effettuate per la sicurezza) contiene maggiori dettagli, quali l'identificatore unico dell'utente. Questo identificatore è importante per evitare che un utente crei un account con lo stesso nome su un altro computer, impersonando così un altro utente. In questo caso, i nomi utente saranno gli stessi, ma gli ID account saranno diversi.

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

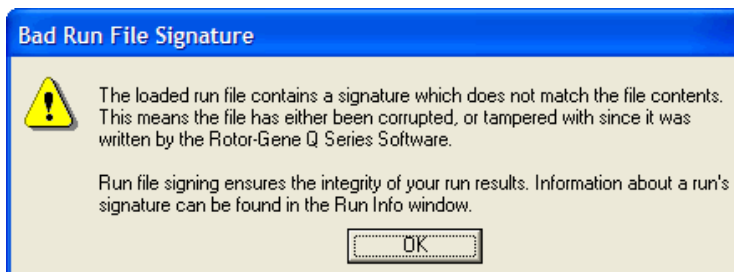


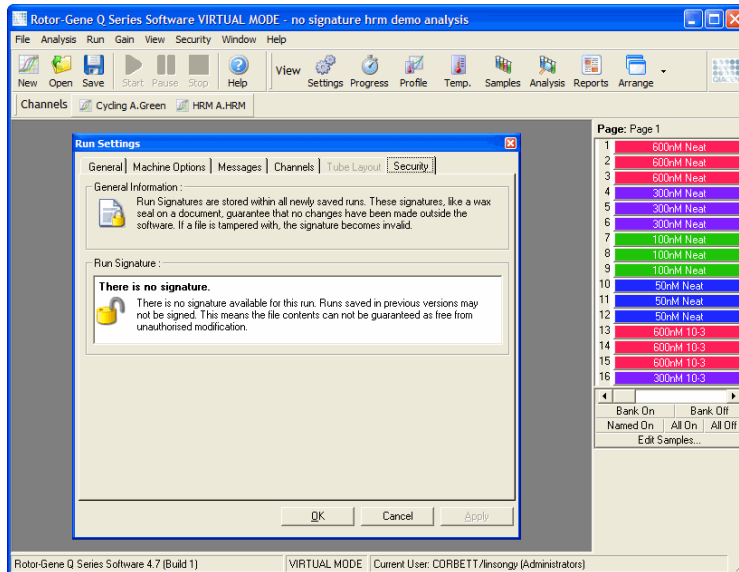
6.9.5 Firme dei processi

La registrazione delle operazioni effettuate è memorizzata 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, le firme dei processi forniscono una sicurezza in più. La schermata presenta la scheda Security (Sicurezza) in Impostazioni processo per un file con una Firma del processo.



La firma del processo è una parola molto lunga che viene generata ogni volta che si salva il file ed è legata al contenuto del file. Ad esempio, la firma di questo file è 517587770f3e2172ef9cc9bd0c36c081. Se il file viene aperto in Notepad e si apporta una modifica (ad esempio, si cambia la data del processo a 3 giorni prima), riaprendo il file compare il seguente messaggio.





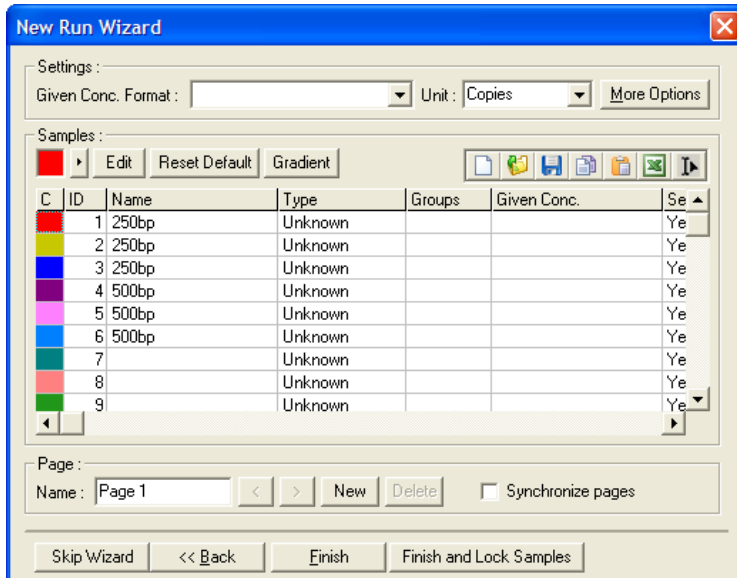
Nota: se si inviano i file per e-mail, il processo di criptazione può invalidare la firma. Per evitarlo, comprimere il file prima di spedirlo per e-mail.

6.9.6 Blocco dei campioni

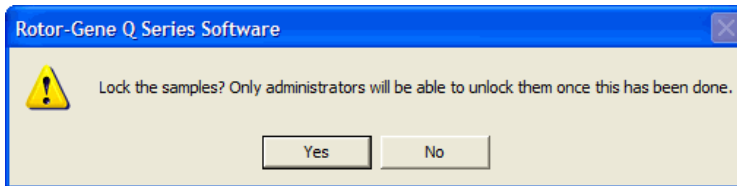
È importante assicurarsi che i nomi dei campioni non siano cambiati accidentalmente o intenzionalmente una volta che un utente ha avviato un processo. Per questo motivo, il software Rotor-Gene Q prevede il blocco dei campioni. I nomi dei campioni possono essere bloccati da qualsiasi utente, ma possono essere sbloccati solo da un amministratore. Per gli utenti che gestiscono il loro computer in modalità 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 (Operatore RG) e RG Analyst (Analista RG) e mantenere segreta la password dell'amministratore. Per sbloccare i file gli utenti avranno così bisogno dell'autorizzazione dell'amministratore.

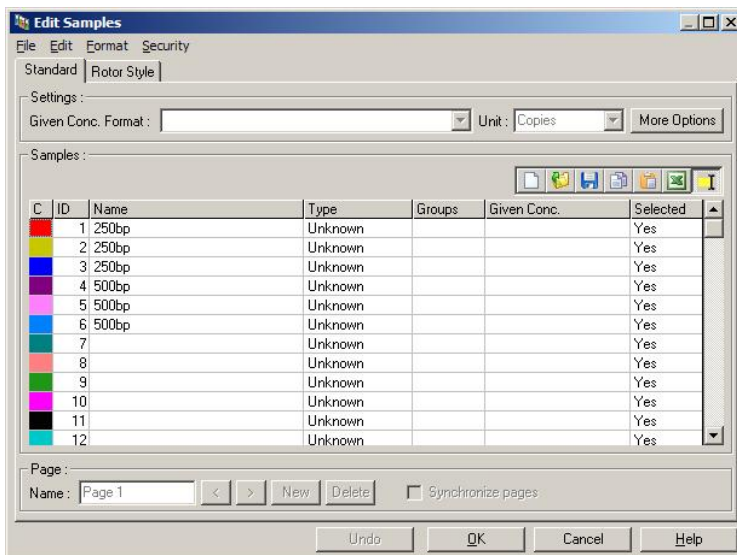
I campioni possono essere bloccati prima di iniziare un processo quando si usa la procedura guidata Advanced (Avanzata) facendo clic su Finish and Lock Samples (Fine e blocco campioni).



Sarà visualizzata la seguente avvertenza. Fare clic su Yes (Sì) per confermare.



Una volta che i campioni sono bloccati, non sarà possibile modificarli nella finestra Edit Samples (Modifica campioni).



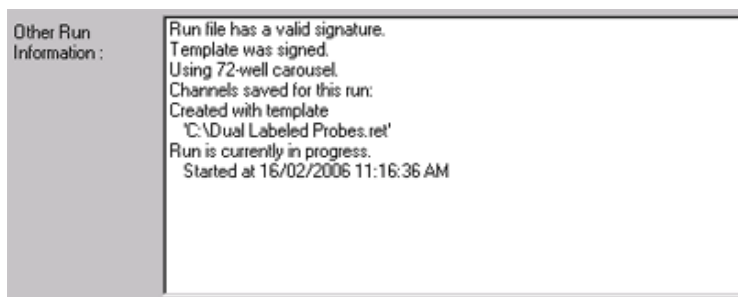
I campioni possono essere anche bloccati e sbloccati nella finestra Edit Samples (Modifica campioni). Tuttavia, solo un amministratore può sbloccare i campioni dopo che sono stati bloccati.



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

6.9.7 Modelli bloccati

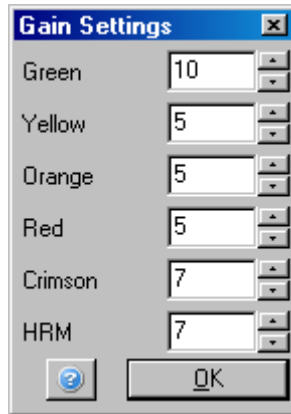
Attualmente non è possibile per l'utente creare file modello di sola lettura con il software Rotor-Gene Q. Se però lo desidera, può specificare come requisito che tutti i processi siano eseguiti con uno specifico file modello. Per assicurare l'accesso in sola lettura al modello, questo deve essere salvato su un'unità 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'unità di rete di questo genere rimane protetto. Per tenere traccia di quale modello sia stato usato, il software Rotor-Gene Q memorizza il nome del file modello che è stato utilizzato. È possibile accedere a questa informazione facendo clic sul pulsante Settings (Impostazioni), che quindi consente la visualizzazione della finestra Run Settings (Impostazioni processo). Le informazioni sul modello sono memorizzate in Other Run Information (Altre informazioni sul processo).



6.10 Menu Gain

Fare clic 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 in alto/in basso accanto a ogni campo di testo per modificare i campi. Quindi fare clic su OK.

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



6.11 Menu Finestra

Questo menù permette di ordinare le finestre in senso orizzontale o verticale, oppure a cascata. Facendo clic sulla freccia a destra del pulsante Arrange (Disponi) è possibile accedere ad altre opzioni.

6.12 Funzione di guida

Quando si usa il pulsante Help (Guida) o il menu Help (Guida), si apre il seguente menu a tendina.

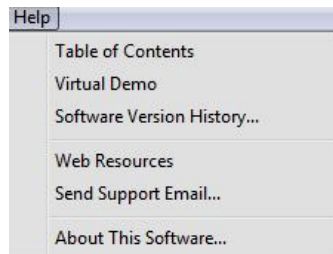


Table of Contents (Sommario):	Consente di accedere alla funzione di guida.
Virtual Demo (Demo virtuale):	Effettua il collegamento a una pagina di un sito Web QIAGEN contenente una dimostrazione interattiva del software.
Software Version History... (Cronologia delle versioni software...):	Fornisce un breve riepilogo delle nuove funzioni aggiunte rispetto alla versione del software installata in precedenza.
Web Resources (Risorse Web):	Aprire una pagina del sito Web QIAGEN in una nuova finestra del browser con importanti ultimissime informazioni sugli strumenti Rotor Gene Q MDx e sui relativi reagenti.
About This Software... (Informazioni relative al software):	Questa opzione fornisce informazioni sulla macchina connessa, il numero di matricola del Rotor-Gene Q MDx e la versione del software.

6.12.1 Invia e-mail per supporto

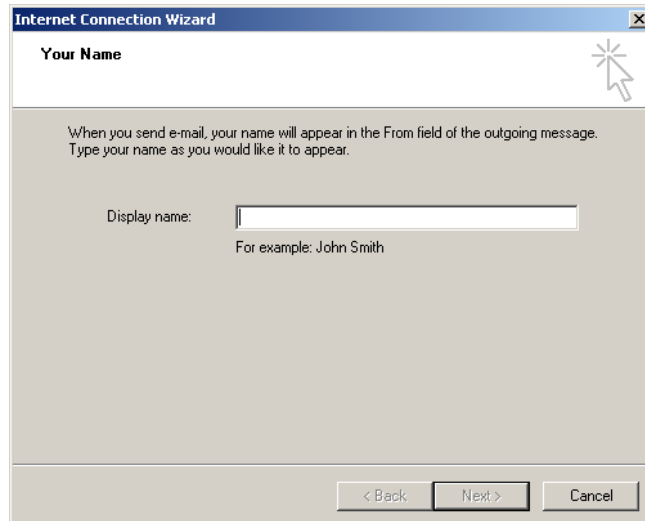
L'opzione Send Support Email (Invia e-mail per supporto) nel menu Help (Guida) consente di inviare un'e-mail di supporto a QIAGEN contenente tutte le informazioni di rilievo di un processo. L'opzione Save As (Salva con nome) consente di salvare tutte le informazioni in un file che è possibile copiare 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 usa la funzione e-mail di supporto sul computer portatile fornito opzionalmente con Rotor-Gene Q MDx (a seconda del paese), la prima volta è necessario configurare le tue impostazioni e-mail.

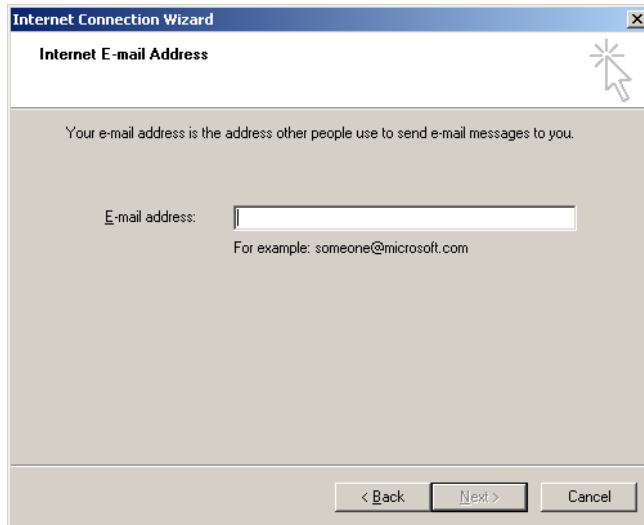
Nota: l'utente può creare le voci del responsabile IT dell'azienda.

Configurazione delle impostazioni e-mail

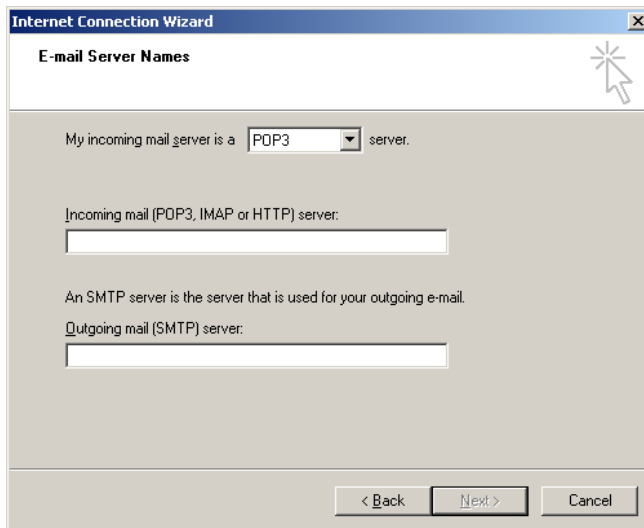
Fare clic sull'opzione Send Support Email... (Invia e-mail per supporto...). Viene visualizzata la finestra seguente.



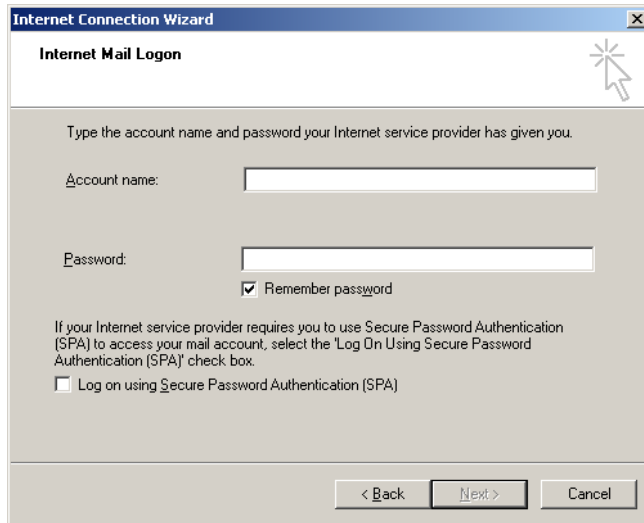
1. Digitare il nome e fare clic su Next (Avanti). Si aprirà l'opzione Internet E-mail Address (Indirizzo e-mail Internet).



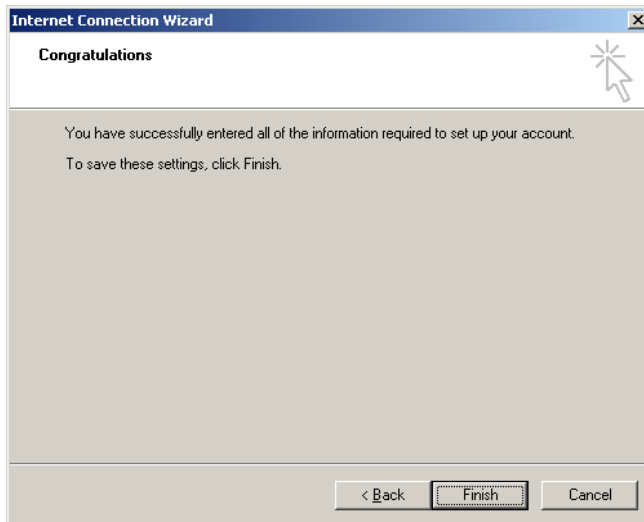
2. Immettere il proprio indirizzo e-mail e premere Next (Avanti). Si aprirà la finestra E-mail Server Names (Nomi server e-mail).



3. Selezionare il tipo di server di posta per le e-mail in arrivo e specificare i nomi server per le e-mail in uscita. Quindi premere Next (Avanti). Si aprirà la finestra Internet Mail Logon (Accesso alla posta Internet).



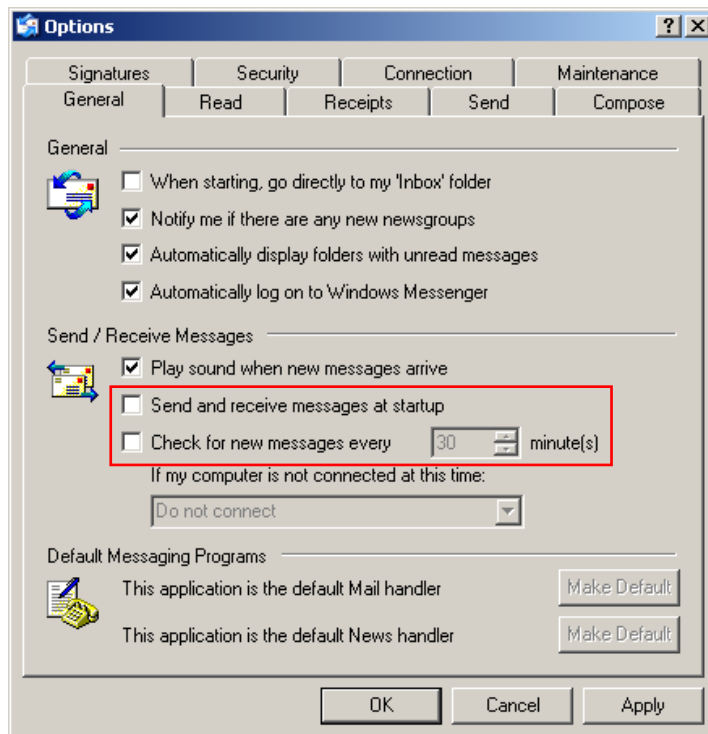
4. Immettere il nome e la password dell'account di posta elettronica, se il server utilizza l'autenticazione tramite password di protezione. Quindi fare clic su Next (Avanti). Si aprirà la finestra Congratulations (Congratulazioni).



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

Configurazione in Outlook

1. Aprire Outlook Express dal menu Start (Avvio) (Start (Avvio) > All programs (Tutti i programmi) > Outlook Express).
2. Selezionare Tools (Strumenti) Options (Opzioni). Viene visualizzata la finestra di seguito.



Importante: per evitare di recuperare le e-mail durante i processi di PCR, disattivare le voci predefinite nella schermata Send/Receive Messages (Invia/ricevi messaggi).

3. Disabilitare Send and receive messages at startup (Invia e ricevi messaggi all'avvio).
4. Disabilitare l'opzione Check for new messages every 30 minutes (Rileva nuovi messaggi ogni 30 minuti).
5. Confermare le modifiche con OK.

7 Funzioni aggiuntive

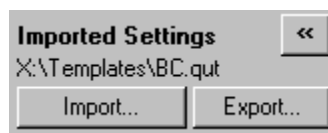
7.1 Modelli di analisi

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 Quantificazione, Fusione, Discriminazione allelica, Grafico di dispersione ed EndPoint supportano modelli di analisi. Queste analisi permettono all'utente di esportare un modello esclusivo per l'analisi (ad esempio, l'analisi Quantificazione consente di esportare e importare file *.qut che contengono impostazioni di quantificazione).

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

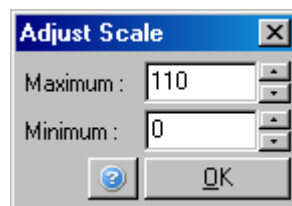


7.2 Apertura di un secondo processo

Mentre si esegue un processo, è possibile aprire e analizzare i processi eseguiti in precedenza. Nella seconda finestra diverse funzioni, fra cui i pulsanti New (Nuovo) o Start Run (Avvia processo), non sono attivate. È possibile avviare un nuovo processo dalla prima finestra una volta terminato il primo.

7.3 Opzioni di scala

Per accedere ad Adjust Scale (Regola scala), fare clic su Adjust Scale... (Regola scala...) in basso nella finestra principale oppure fare clic con il pulsante destro del mouse sul grafico e selezionare Adjust Scale... (Regola scala...) nel menu che viene visualizzato. Si può immettere manualmente una scala nella finestra visualizzata.



Per accedere a Auto-Scale (Scala automatica), fare clic su Auto-Scale... (Scala automatica...) in basso nella finestra principale oppure fare clic con il pulsante destro del mouse sul grafico e selezionare Auto-Scale... (Scala automatica...) nel menu che viene visualizzato. Auto-Scale (Scala automatica) tenta di adattare la scala ai valori massimi e minimi dei dati.

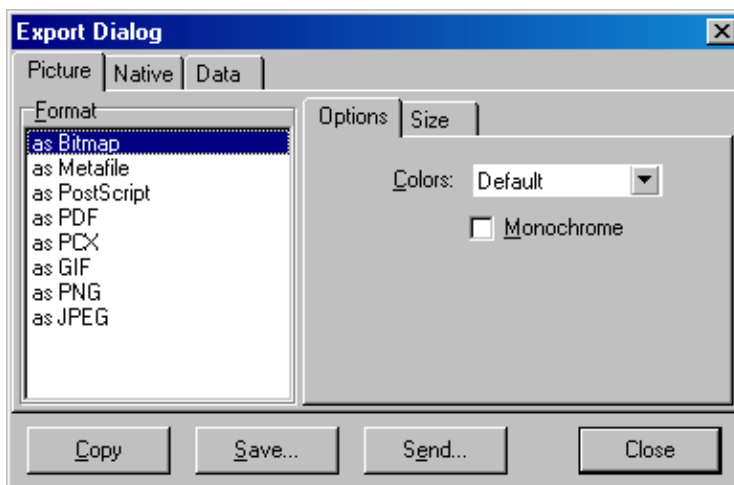
Per accedere a Default Scale (Scala predefinita), fare clic su Default Scale... (Scala predefinita...) in basso nella finestra principale oppure fare clic con il pulsante destro del mouse sul grafico e selezionare Default Scale... (Scala predefinita...) nel menu che viene visualizzato. Default Scale (Scala predefinita) ripristina la scala di visualizzazione da 0 a 100 unità di fluorescenza.

7.4 Esportazione di grafici

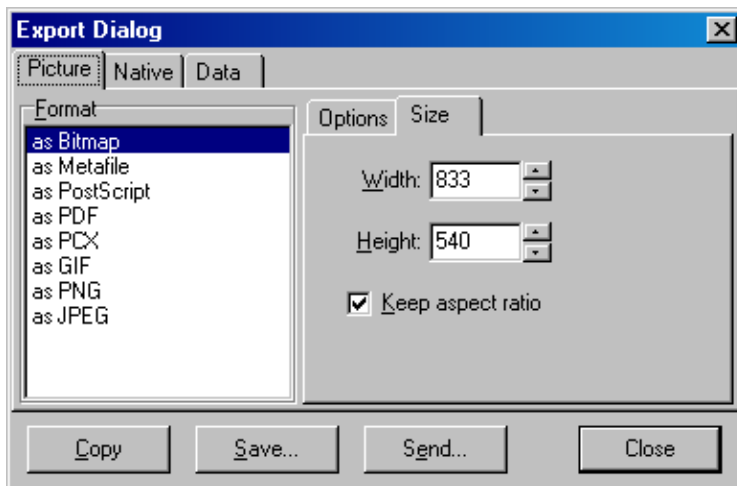
Esportazione di immagini

I passaggi di seguito descrivono come salvare un'immagine.

1. Fare clic con il pulsante destro del mouse sull'immagine e selezionare Export (Esporta) dal menu visualizzato.
2. Viene visualizzata la finestra Export Dialog (Finestra di dialogo di esportazione). Selezionare il formato desiderato dall'elenco Format (Formato).



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



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

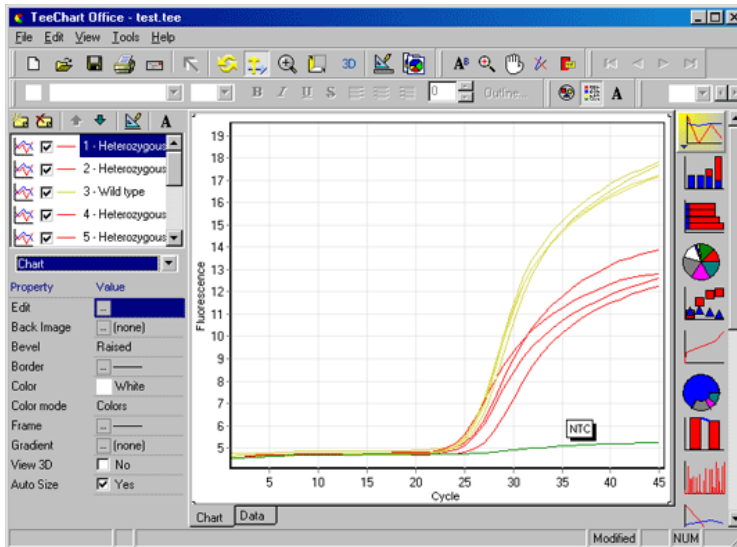
Se è richiesta un'immagine ad alta risoluzione, consigliamo di aumentare le dimensioni dell'immagine fino a soddisfare le proprie esigenze oppure di salvare il grafico come metafile (*.emf, *.wmf). Si tratta di un formato a base vettoriale che può essere aperto in software quali Adobe® Illustrator® e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

Esportazione in formato nativo

I grafici del software Rotor-Gene Q utilizzano la componente di terze parti TeeChart® sviluppata dal software Steema. Per salvare un grafico nel formato nativo, selezionare la scheda Native (Nativo) nella finestra Export Dialog (Finestra di dialogo di esportazione) (vedere la schermata precedente) e fare clic su Save (Salva). Il formato nativo 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, fare clic sull'icona TeeChart sul desktop.

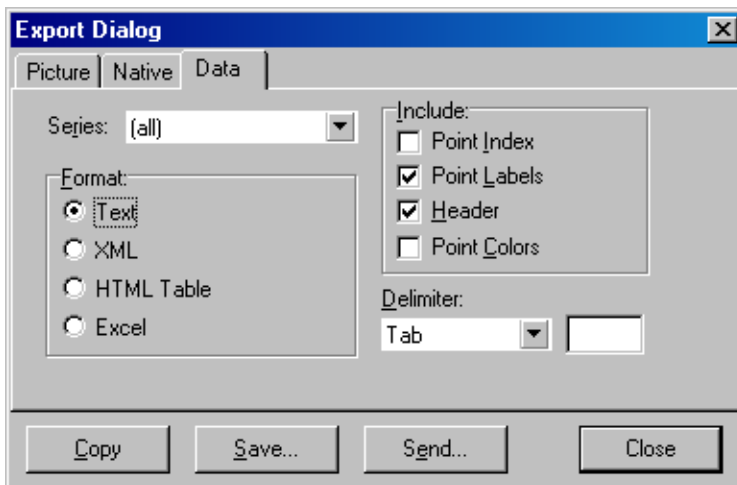


TeeChart Office permette di manipolare i grafici esportati, anche con cambio di colore delle curve, aggiunta di note, cambiamento di caratteri e regolazione dei punti dati.




Esportazione di dati

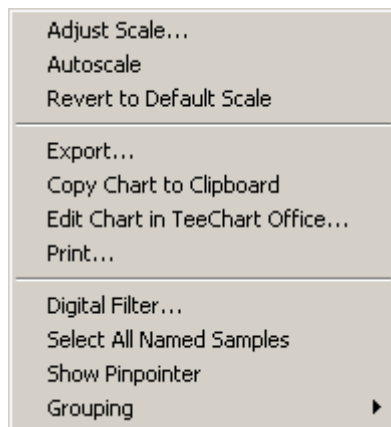
Per esportare dati in vari formati, selezionare la scheda Data (Dati) nella finestra Export Dialog (Finestra di dialogo di esportazione). Il file esportato contiene i punti dati grezzi usati nel grafico.



L'esportazione dei dati grezzi e di analisi può essere effettuata anche selezionando Save As (Salva con nome) nel menu File (vedere la sezione 6.5).

7.5 Icona chiave inglese

L'icona con la chiave inglese  è visualizzata in basso a sinistra nella finestra principale. Facendo clic sull'icona con la chiave inglese si accede a diverse opzioni. Si può accedere a queste opzioni anche facendo clic con il pulsante destro del mouse sul grafico.



Adjust Scale (Regola scala), Vedere la sezione 7.3.
Autoscale (Scala automatica),
Revert to Default Scale (Torna a scala predefinita):

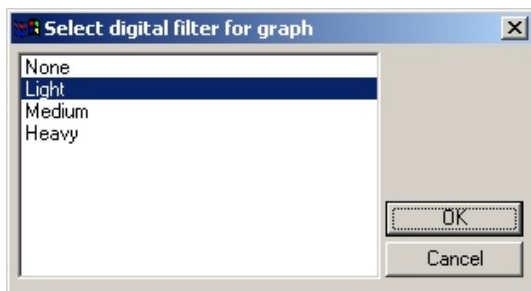
Export... (Esporta...): Salva il grafico in vari formati (vedere la sezione 6.4).

Copy Chart to Clipboard (Copia grafico negli appunti): Copia negli appunti l'immagine del grafico.

Edit Chart in TeeChart Office... (Modifica grafico in TeeChart Office...): Apre il grafico direttamente in TeeChart Office per la modifica (vedere la sezione 6.4).

Print (Stampa): Stampa il grafico.

Digital Filter... (Filtro digitale...): Modifica il filtro digitale attualmente selezionato sul grafico. Il filtro digitale uniforma i dati mediante una finestra scorrevole di punti.

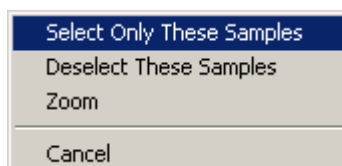


Show Pinpointer (Mostra puntatore): Apre una finestra che visualizza le coordinate esatte della posizione del puntatore del mouse.

Grouping (Raggruppamento): Raggruppa visivamente i campioni con nomi identici. Può essere utile per i processi con rotore al completo. La selezione di questa opzione non influisce sui valori calcolati.

7.6 Opzioni dell'area selezionata

Si può selezionare un'area di un grafico facendo clic e tenendo premuto il pulsante sinistro del mouse e trascinando il puntatore. Vengono visualizzate le seguenti opzioni.



Select Only These Samples
Selezionare solo questi
campioni:

I campioni esterni all'area selezionata vengono deselezionati.

Select Only These Samples
Selezionare solo questi
campioni:

I campioni esterni all'area selezionata vengono deselezionati.

Zoom (Ingrandisci):

Ingrandisce l'area selezionata del grafico. Fare clic sul pulsante Default Scale (Scala predefinita) per ridurre.

8 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 rotore.

Mantenere l'area del banco da lavoro pulita, senza 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.

Nota: utilizzare solo parti fornite da QIAGEN.

8.1 Pulizia della superficie del Rotor-Gene Q MDx.

Le superfici esterne del Rotor-Gene Q possono essere pulite utilizzando comuni prodotti chimici di laboratorio.

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

8.2 Decontaminazione della superficie del Rotor-Gene Q MDx

Se la camera rotore si contamina, è possibile pulirla strofinando le superfici con un panno privo di pelucchi inumidito (ma che non goccioli) con una soluzione di candeggina allo 0,1% (v/v).^{*} Strofinare la camera con un panno privo di pelucchi inumidito con acqua di grado PCR per rimuovere le tracce di candeggina.

8.3 Riparazione del Rotor-Gene Q

Per la riparazione o la manutenzione del Rotor-Gene Q, contattare i servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo <https://www.qiagen.com/service-and-support/technical-support/technical-support-form/>.

^{*} Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

9 Verifica ottica temperatura

La verifica ottica 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. La procedura di OTV viene eseguita con un Rotor-Disc OTV Kit (vedere la sezione 16). 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 del Rotor-Disc OTV*.

9.1 Principio OTV

La procedura OTV sfrutta le proprietà ottiche di 3 cristalli liquidi termocromatici (Thermochromatic Liquid Crystals, TLC)* come riferimenti assoluti della temperatura. Quando i cristalli TLC vengono riscaldati, da opachi diventano trasparenti a temperature molto precise (50, 75 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 di fabbrica dell'OTV Rotor-Disc per verificare se il Rotor-Gene Q MDx rientra nelle specifiche di temperatura.

9.2 Componenti del Rotor-Disc OTV Kit

Per eseguire una OTV occorrono i seguenti componenti:

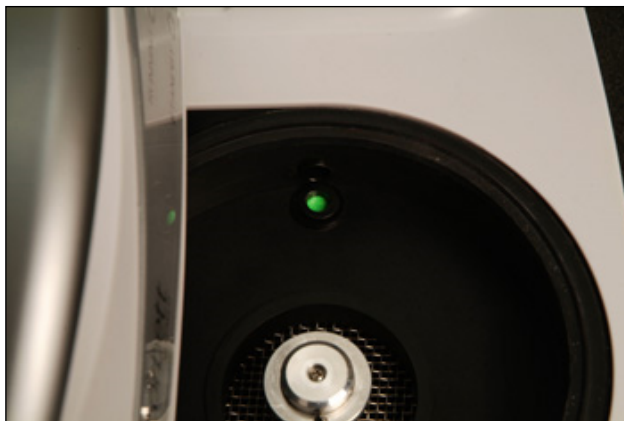
- Un Rotor-Disc OTV Kit, comprendente:
 - Rotore sigillato Rotor-Disc 72 OTV (contiene i TLC)
 - Inserto fluorescente per scatter plate (strumento Rotor-Gene 3000 o strumenti Rotor-Gene Q/6000)

* Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

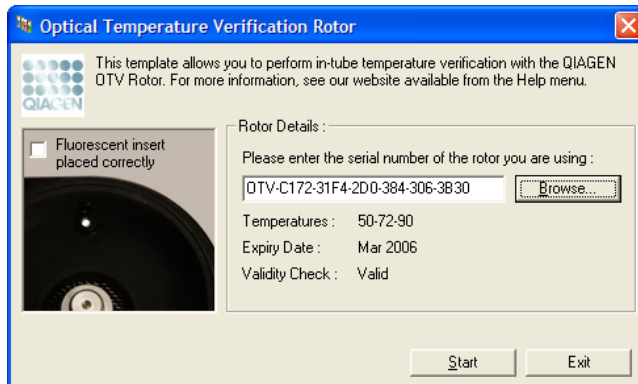
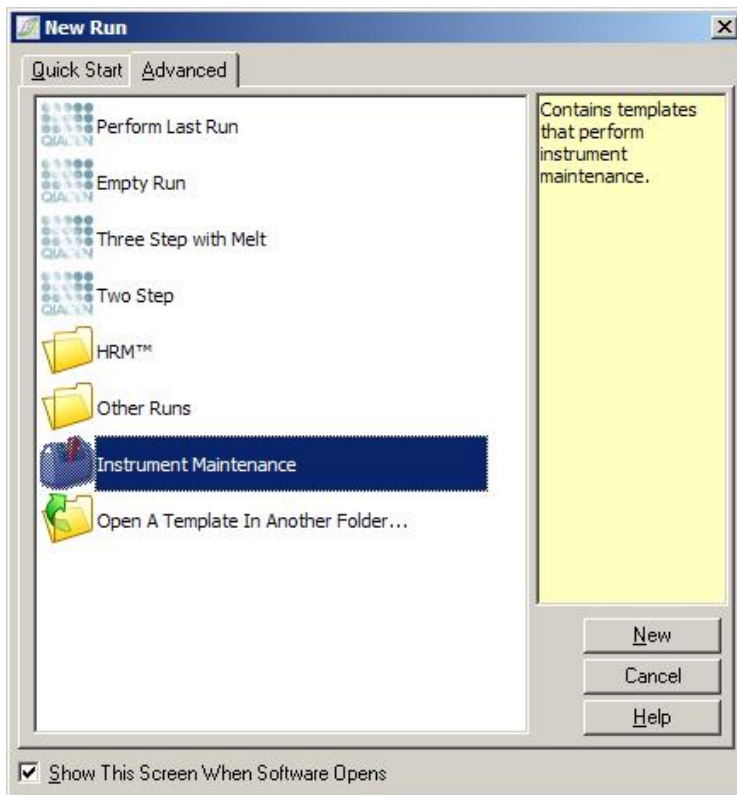
- Supporto multimediale rimovibile contenente i seguenti file: File con numero di matricola e data di scadenza del rotore OTV (*.txt); file modello di test OTV (*.ret); Scheda prodotto (*.pdf); file di calibrazione di fabbrica (*.rex)
- Scheda prodotto
- Software serie Rotor-Gene Versione 1.7 o superiore, contenente la procedura guidata per OTV Rotor
- Rotor-Disc 72 Rotor
- Rotor-Disc 72 Locking Ring

9.3 Esecuzione di un OTV

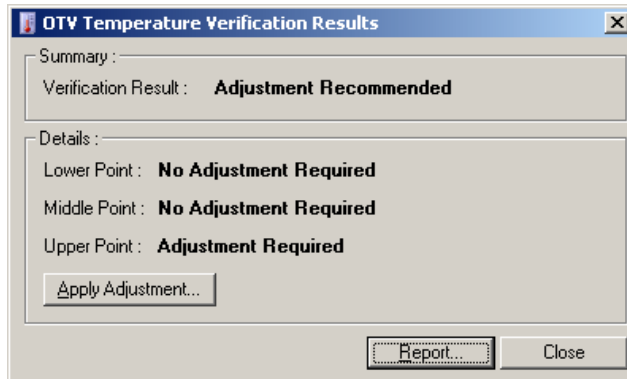
1. Collocare l'insero fluorescente sopra la lente di emissione sul fondo della camera del Rotor-Gene Q MDx.
2. Collocare l'OTV Rotor-Disc in un Rotor-Disc 72 Rotor. Fissare con un Rotor-Disc 72 Locking Ring. Collocare il gruppo nel Rotor-Gene Q MDx facendo attenzione allo scatto che indica l'inserimento.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



3. Accedere alla procedura guidata Advanced (Avanzata) nella finestra New Run (Nuovo processo). Nella procedura guidata Advanced (Avanzata) fare clic su Instrument maintenance (Manutenzione strumento) e poi su OTV. La procedura guidata richiede di inserire il numero di matricola dell'OTV, che si trova sull'anello dell'OTV. Quindi fare clic 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 è necessaria una regolazione, l'utente dovrà fare clic su Apply Adjustment (Applica regolazione). Questo invita l'utente ad eseguire un processo di verifica. Completata la verifica, non dovrebbero essere richieste altre regolazioni. 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.

10 Analisi di fusione ad alta risoluzione

L'analisi di fusione ad alta risoluzione (High Resolution Melt, 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 la figura sottostante). Uno strumento HRM raccoglie i segnali fluorescenti con precisione ottica e termica estremamente alta, creando molte possibilità di applicazione.

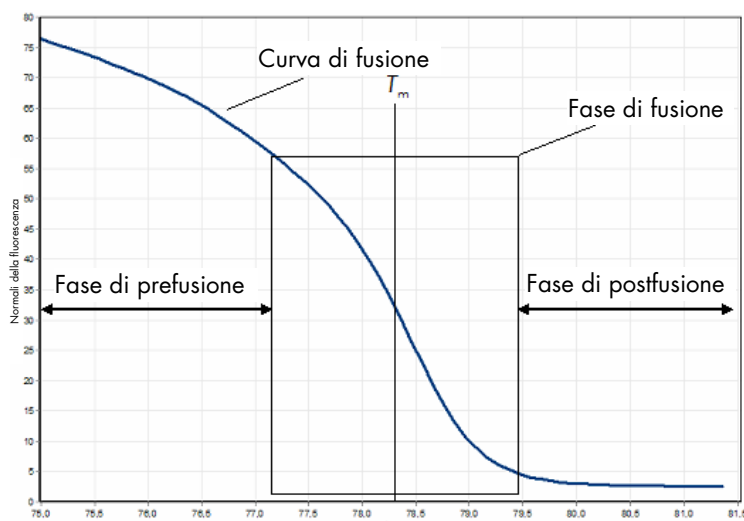


Grafico HRM standard. La curva di fusione traccia la transizione dall'alta fluorescenza della fase iniziale di prefusione, passando per la diminuzione di fluorescenza della fase di fusione, fino al livello basale della fluorescenza nella fase di postfusione. La fluorescenza diminuisce man mano che il 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 di solito viene 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 può caratterizzare 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 a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, 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, ad 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 degli esami 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.

10.1 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

10.2 Sostanze chimiche

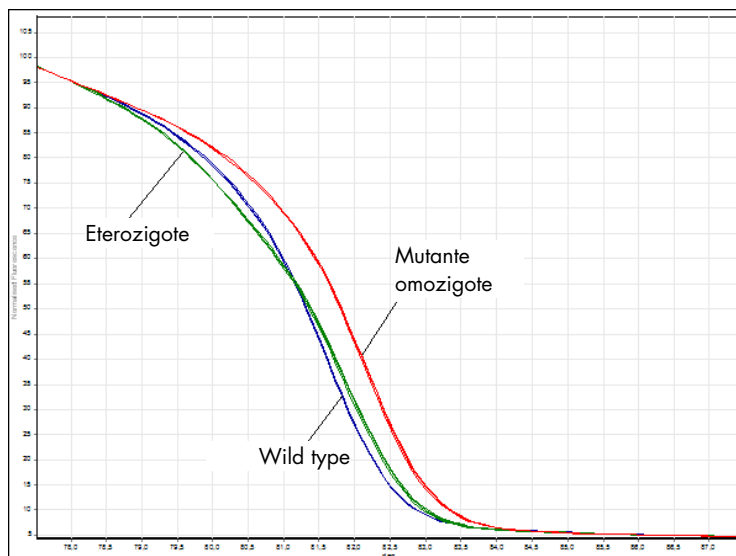
QIAGEN offre il Type-it® HRM PCR Kit per l'analisi degli SNP e delle mutazioni mediante HRM e l'EpiTect® HRM PCR Kit per l'analisi della metilazione. Entrambi i kit contengono il colorante EvaGreen di terza generazione, intercalante e fluorescente. Questi kit combinano un tampone HRM ottimizzato e una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

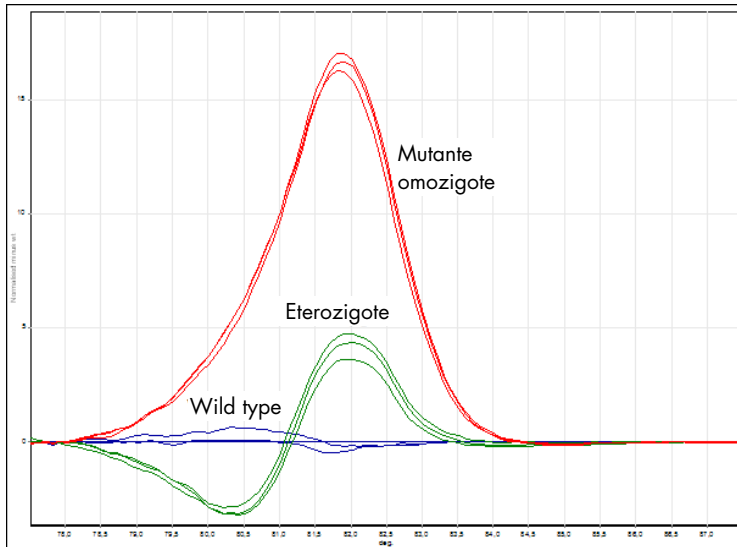
Nota: tutti i kit e reagenti QIAGEN HRM sono idonei all'uso con gli strumenti Rotor-Gene Q solo per le applicazioni descritte nei manuali dei rispettivi kit QIAGEN.

10.3 Esempio di genotipizzazione di SNP

Nell'esempio riportato, il Type-it HRM PCR Kit 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**

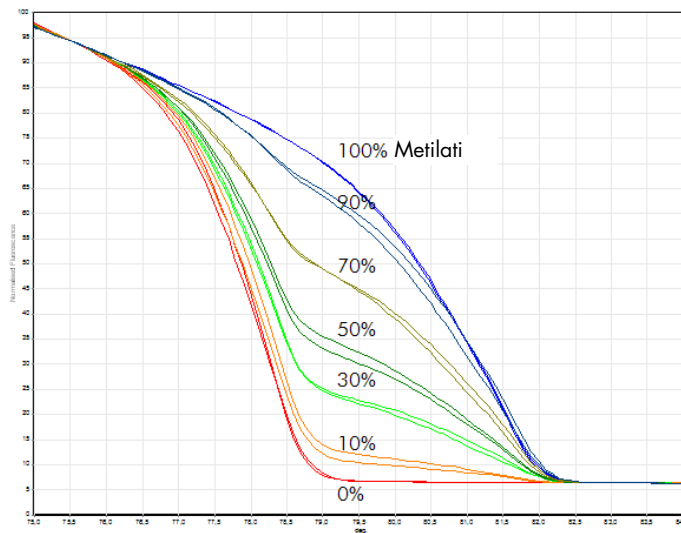
HRM Results - HRM A.HRM (Page 1)				
No.	C	Name	Genotype	Confidence %
22	■	AA Human SNP rs60031276	homo AA	100,00
23	■	unknown	homo AA	99,49
24	■	unknown	homo AA	99,76
28	■	AG Human SNP rs60031276	hetero AG	100,00
29	■	unknown	hetero AG	99,49
30	■	unknown	hetero AG	98,47
34	■	GG Human SNP rs60031276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

Genotizzazione 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 Kit. 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. **C** I genotipi per i campioni sconosciuti sono stati assegnati dal software Rotor-Gene Q.

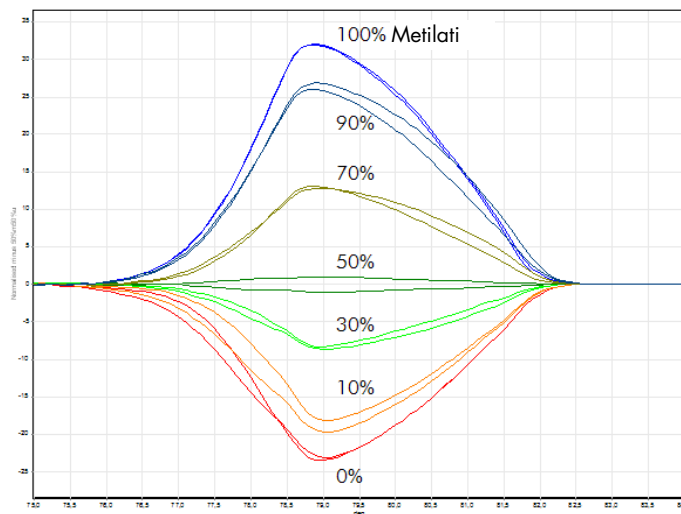
10.4 Esempio di analisi della metilazione

Nell'esempio riportato, si è utilizzato l'EpiTect HRM PCR Kit 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 utilizzando l'EpiTect HRM Kit. Sono mostrate **A** una curva di fusione standard normalizzata e **B** un grafico differenziale normalizzato al campione metilato al 50%.

10.5 Linee guida per la riuscita dell'analisi HRM

La riuscita dell'analisi HRM dipende in larga misura dalla sequenza particolare ricercata. 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, possono compromettere l'esito. 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 offrono una risoluzione inferiore. Questo perché, ad esempio, una singola variazione di base ha un effetto maggiore sul comportamento in fusione di un amplicone da 100 bp rispetto 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 HRM. 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 real-time PCR può essere molto utile nella ricerca degli errori nelle analisi HRM. I grafici di amplificazione dovrebbero avere un C_T (ciclo soglia) pari o inferiore a 30. 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 tra loro di 3 valori C_T al massimo. 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 presentano 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 (ad esempio, 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 dei campioni 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, ad esempio, di una preparazione dell'esame di scarsa consistenza (ad esempio, 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, per cui 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 post-fusione

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

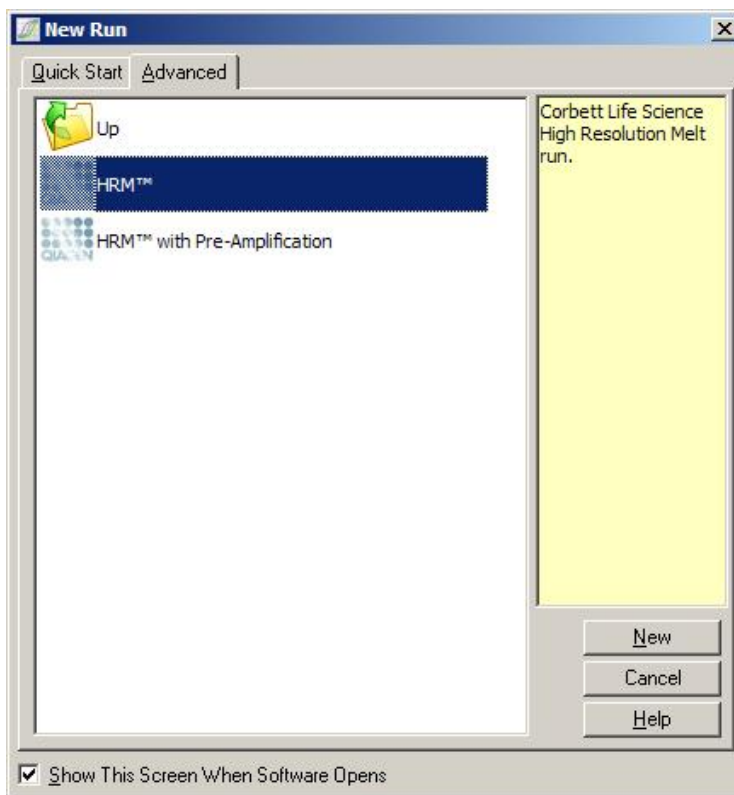
10.6 Preparazione dei campioni

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.

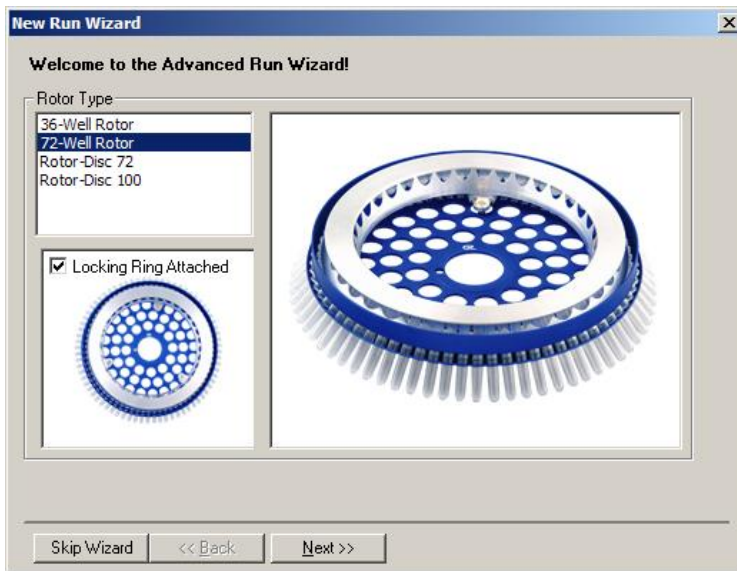
Nota: a 260 nm un'unità di assorbanza è pari a 50 µg/ml di DNA. Il DNA puro fornirà un rapporto tra 260 nm e 280 nm di 1,8.

10.7 Preparazione del software

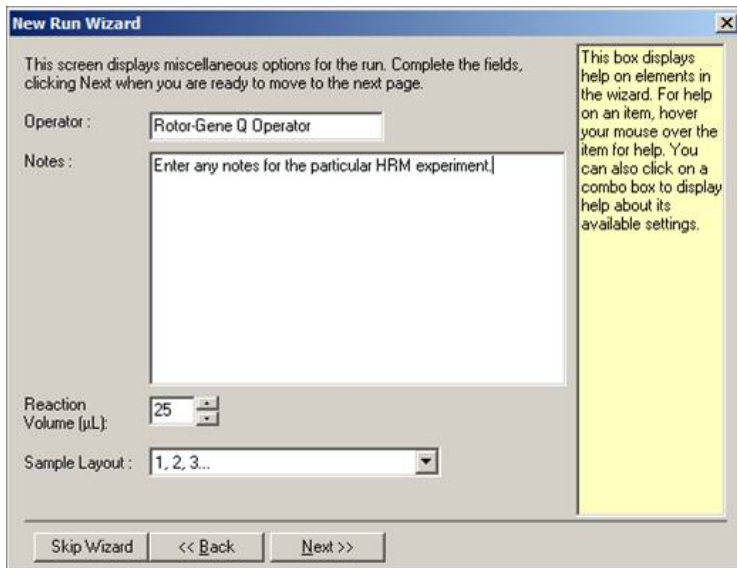
1. Aprire un nuovo file di processo selezionando New... (Nuovo...) dal menu File. Nella procedura guidata Advanced (Avanzata), selezionare HRM.



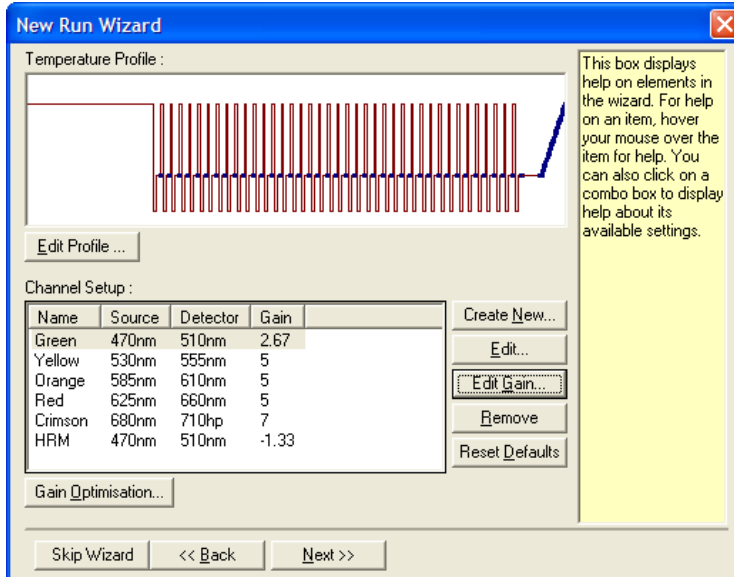
2. Impostare il tipo di rotore (in questo esempio è stato utilizzato il 72-Well Rotor). Verificare che l'anello di bloccaggio sia al suo posto e che la casella Locking Ring Attached (Anello di bloccaggio applicato) sia stata selezionata prima di passare alla fase successiva.



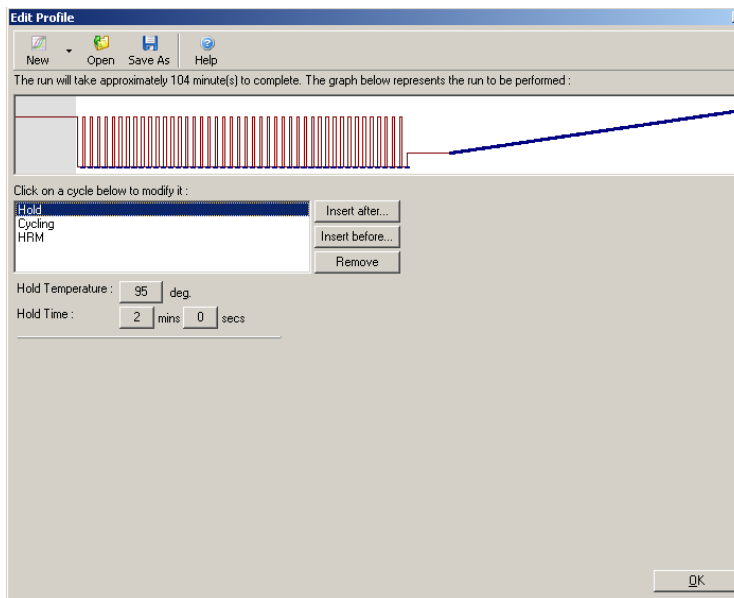
3. Impostare i dettagli del processo. Immettere il nome dell'operatore (opzionale) e aggiungere eventuali note sull'esperimento (opzionale). Selezionare il volume di reazione (obbligatorio) e il layout desiderato del campione.



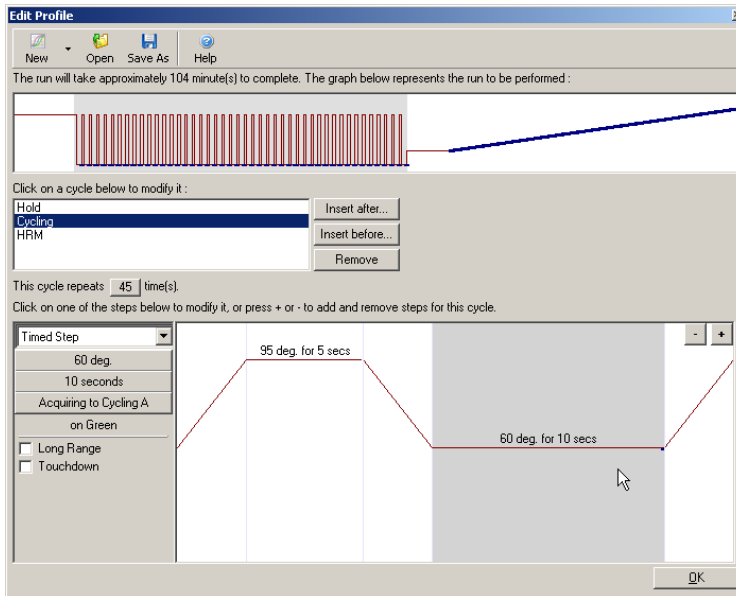
- Fare clic su Edit Profile... (Modifica profilo...) per modificare tempi e temperature della reazione.



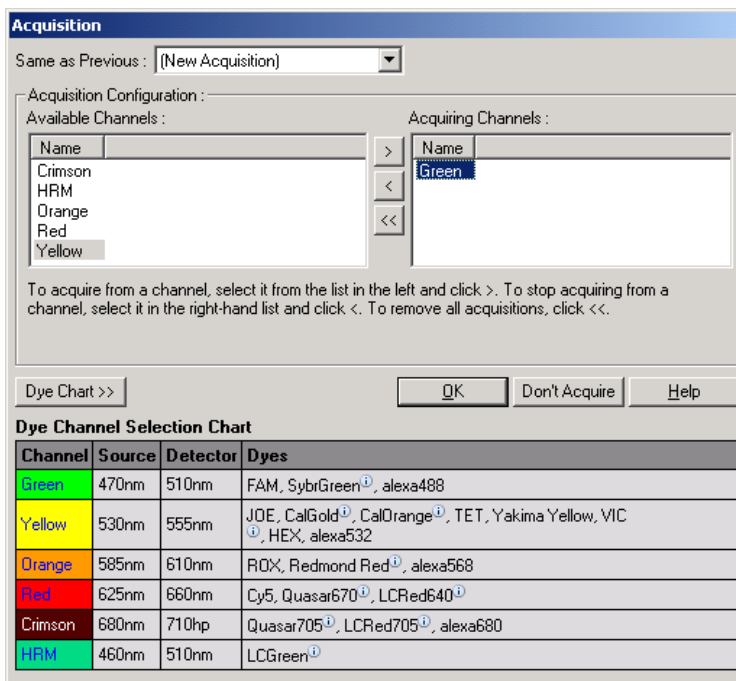
- Impostare un adeguato tempo di sosta iniziale. Questo tempo dipende dal tipo di DNA polimerasi utilizzato. Il Type-it HRM PCR Kit e il EpiTect HRM PCR Kit richiedono un tempo di attivazione di 5 minuti. Il tempo di attivazione predefinito è di 10 minuti.



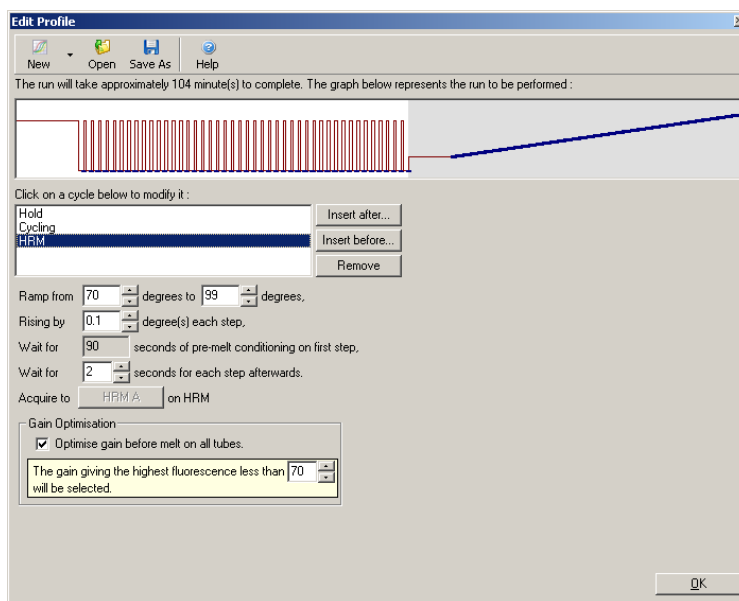
6. Modificare il ciclo per adattarlo all'amplicone.



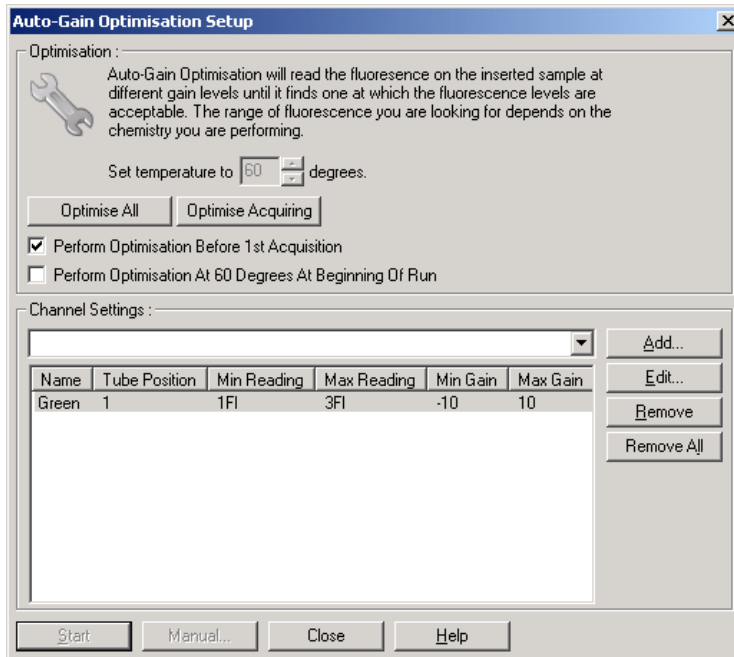
7. Verificare che vengano acquisiti i dati della fluorescenza. Acquisire dati per il canale verde alla fine della fase di annealing.



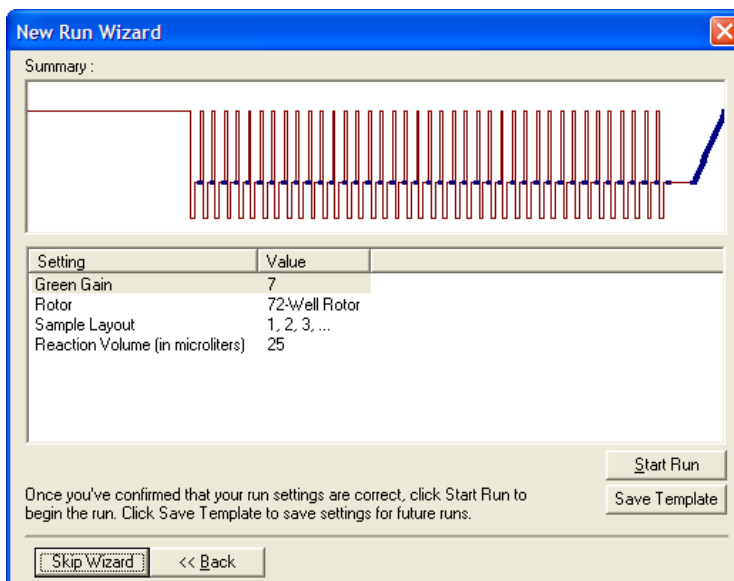
8. Impostare le condizioni del processo HRM. Modificare le condizioni per adattarle all'amplicone. Per la prima serie di esperimenti, consentire un dominio di fusione ampio. Utilizzare il valore T_m teorico come guida per un range idoneo. Una volta stabilito dove si fonderà il prodotto, ridurre il dominio di fusione a non oltre i 10°C. Verificare che la fusione abbia inizio 5°C prima della prima transizione di fusione. La rampa predefinita è fissata a 0,1°C con una sosta di 2 s a ogni fase. La rampa minima di transizione è di 0,05°C con una seconda sosta a ogni fase. I dati sono acquisiti automaticamente al canale HRM. L'Automatic Gain Optimisation (Ottimizzazione automatica del gain) viene eseguita per impostazione predefinita. 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.



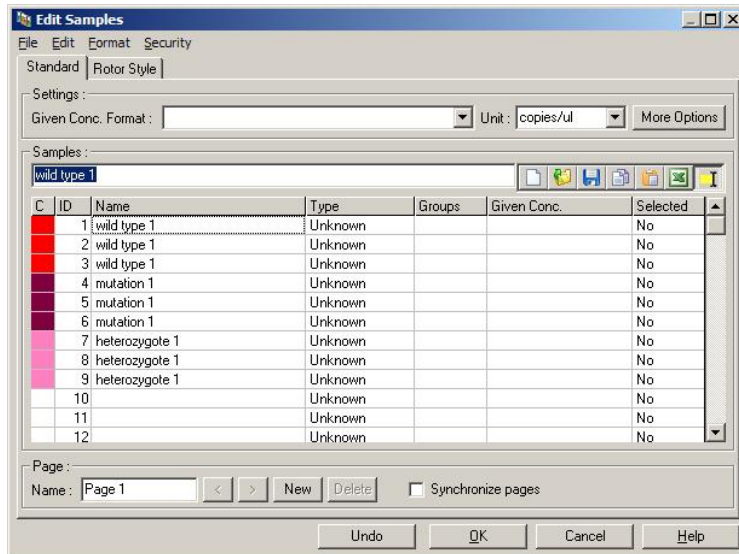
9. Facoltativo: impostare Auto-Gain Optimisation (Ottimizzazione automatica del gain). Questo è applicabile alla sola fase di amplificazione in tempo reale e l'impostazione è per il canale verde. Fare clic sul pulsante Optimize Acquiring (Ottimizza acquisizione) (per ottimizzare solo i canali utilizzati in un processo). Il momento migliore per l'ottimizzazione è subito prima della prima fase di acquisizione, pertanto selezionare la casella Perform Optimization Before First Acquisition (Eseguire l'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, fare clic sul nome del canale per selezionarlo nell'elenco e poi sul pulsante Edit (Modifica).



10. Avviare il processo facendo clic su Start Run (Avvia processo) e salvare sul proprio computer il file del processo.



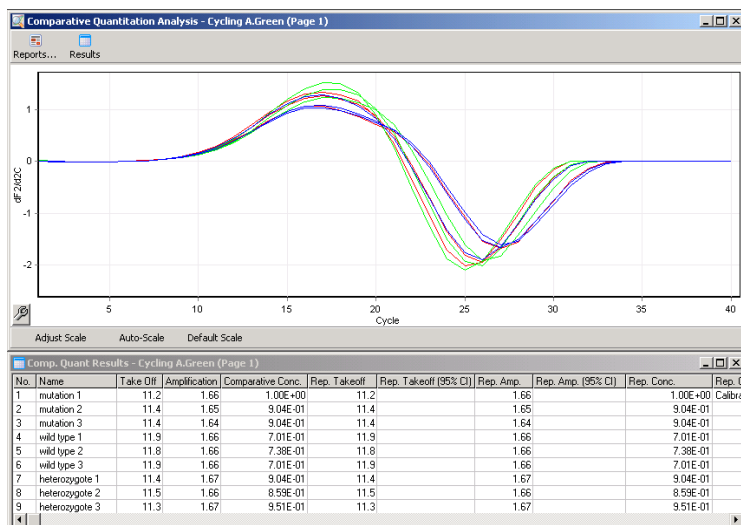
11. Modificare i nomi dei campioni (opzionale). I nomi dei campioni possono essere modificati durante o dopo un processo.



10.8 Analisi real-time PCR dei dati

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

1. Analizzare i dati in tempo reale mediante l'opzione Quantitation (Quantificazione) nella finestra Analysis (Analisi). 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 a 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 esempio primer) o l'azione di inibitori.
3. Utilizzare l'opzione Comparative Quantitation (Quantificazione comparativa) della finestra Analysis (Analisi) 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 nella colonna "Amplification" (Amplificazione) 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 (Fusione) nella finestra Analysis (Analisi). 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.

10.9 Analisi dei dati HRM

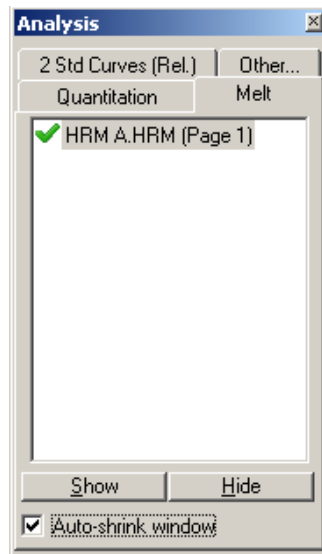
L'analisi HRM permette l'appaiamento visivo e automatico dei genotipi. I risultati possono essere visualizzati come grafico di fusione normalizzato o come grafico differenziale. Le curve normalizzate forniscono la rappresentazione base dei diversi genotipi basati sullo spostamento della curva (per gli 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 a ogni transizione termica. I grafici differenziali forniscono una visualizzazione alternativa della differenza fra le transizioni nella curva di fusione.

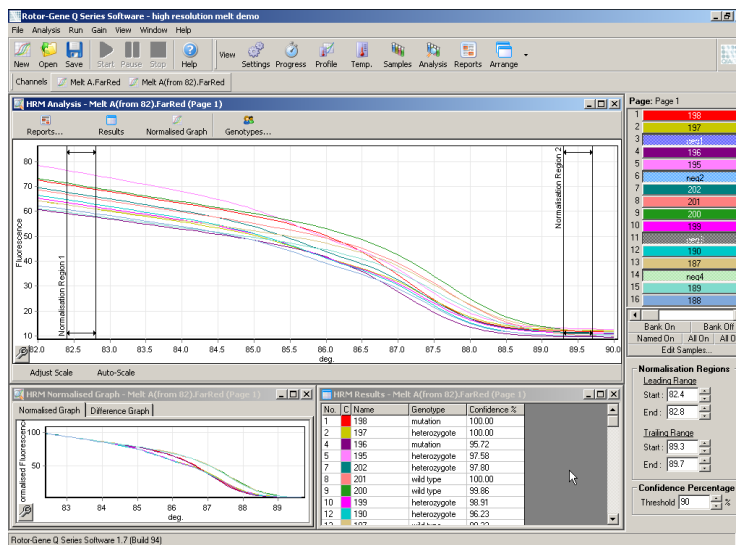
Nota: l'analisi della prima derivata della curva di fusione (usata dall'opzione standard) Melt (Fusione) della finestra Analysis (Analisi) è considerata inadeguata per l'analisi HRM. Questo perché ogni derivazione dei dati aggiunge rumore artificiale e rende più difficile l'interpretazione dei dati.

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

1. Selezionare l'opzione HRM dalla finestra Analysis (Analisi).

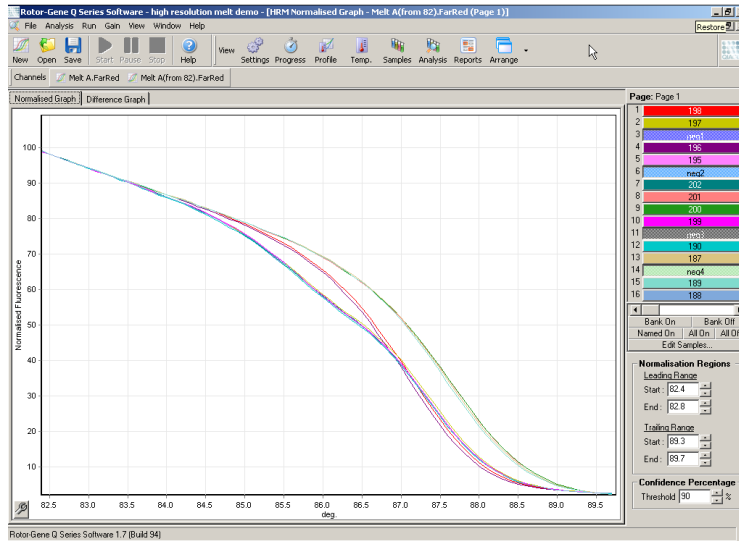


2. Si aprono delle finestre contenenti i dati grezzi, il grafico normalizzato e i risultati. La finestra dei dati grezzi permette aggiustamenti delle regioni di normalizzazione. La normalizzazione permette di confrontare tutte le curve con lo stesso livello di segnale fluorescente iniziale e finale per 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 (facendo clic e trascinando) si permette al software di regolarsi sulla pendenza della linea base. Per verificare che le curve si normalizzino efficientemente, evitare di ampliare le regioni di normalizzazione fino alla fase di fusione.

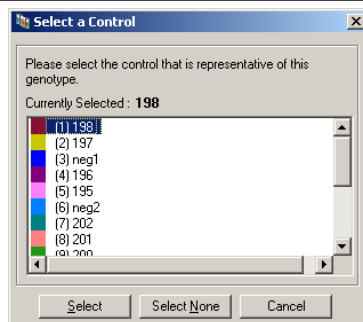
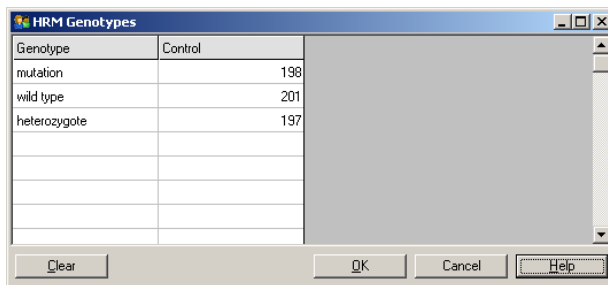


Nota: raccomandiamo di spostare i cursori solo se si desidera evitare le aree della curva di fusione. Il movimento dei cursori verso le transizioni della fase di fusione possono influire sui grafici di sottrazione e sulle percentuali di confidenza.

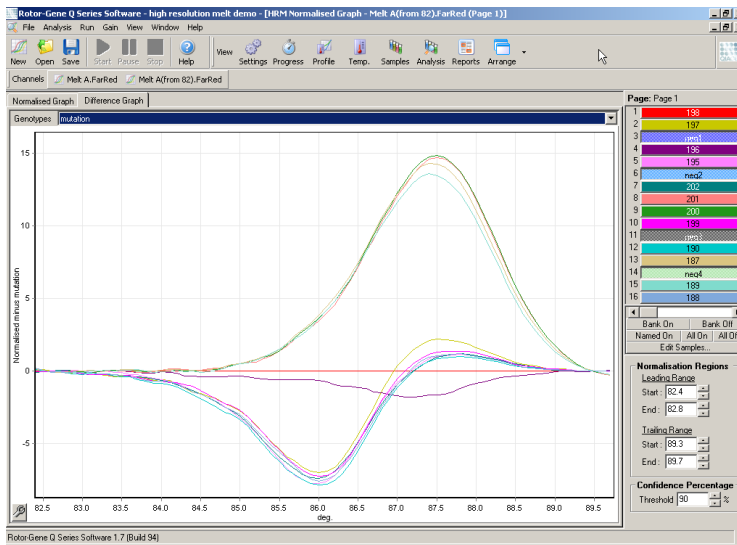
3. La finestra Normalised Graph (Grafico normalizzato) visualizza le curve di fusione normalizzate. I campioni possono essere visualizzati anche come grafico differenziale rispetto a uno dei controlli.



4. Fare clic sul pulsante Genotypes... (Genotipi...) 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). Quindi selezionare il genotipo che si desidera 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 di 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.

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: 83.3
 End: 89.7
 Confidence Percentage
 Threshold: 90%

11 Risoluzione dei problemi

Questa sezione fornisce informazioni sulle procedure da seguire se si verifica un errore durante l'utilizzo del Rotor-Gene Q MDx System.

Per eventuale ulteriore assistenza, contattare i servizi tecnici QIAGEN utilizzando le informazioni di contatto riportate di seguito:

Sito Web: support.qiagen.com

Quando si contattano i servizi tecnici QIAGEN per un errore del Rotor-Gene Q MDx, prendere nota dei passaggi che hanno portato all'errore e delle informazioni visualizzate nelle finestre di dialogo. Questo agevolerà i servizi tecnici QIAGEN nella risoluzione del problema.

Quando ci si rivolge ai servizi tecnici QIAGEN relativamente ad errori, tenersi pronti a fornire le seguenti informazioni:

- Numero di serie, tipo versione del Rotor-Gene Q MDx
- Versione del software
- Momento in cui si è verificato l'errore per la prima volta
- Frequenza della ricorrenza dell'errore (vale a dire, errore intermittente o persistente)
- Descrizione dettagliata della situazione in cui si è riscontrato l'errore
- Foto dell'errore, se possibile
- Copia dei file di registro

Tali informazioni aiuteranno voi e lo specialista dei servizi tecnici QIAGEN a gestire con la massima efficacia il problema.

Nota: le informazioni sulle ultime versioni di software e protocollo si trovano alla pagina www.qiagen.com. In alcuni casi potrebbero essere disponibili aggiornamenti utili a risolvere specifici problemi.

11.1 Log Archives

Il software mantiene una registrazione non modificata di ogni processo, insieme alle informazioni diagnostiche, nell'archivio Log Archives. Usando l'opzione Help (Guida), Send Support Email (Invia e-mail per il supporto), è possibile inviare un'e-mail insieme a tutte le informazioni diagnostiche necessarie ai servizi tecnici QIAGEN (vedere la sezione 6.12.1).

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

11.2 Errori hardware e software

11.2.1 Risoluzione dei 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 è stato ottenuto alcun dato HRM

Setup non corretto

Verificare le impostazioni dei filtri.
Verificare che il tipo di rotore sia corretto.
Verificare che siano stati usati i reagenti corretti.
Verificare che la reazione sia stata impostata correttamente.
Eseguire un esperimento con controllo positivo (vale a dire un esame che notoriamente fornisce risultati).

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 (Ottimizzazione automatica del gain) (vedere pagina 62).

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.

11.3 Messaggi di errore e avvertenze

11.3.1 Errori generali dello strumento

Messaggio di errore	Commenti e suggerimenti
Can't open the serial port <COMPORT> (Impossibile aprire la porta seriale <PORTA COM>)	Questo errore si verifica all'avvio del software se il software non riesce a comunicare con lo strumento tramite la porta COM configurata. Di solito la causa sono cavi difettosi o staccati, difetti delle porte seriali, problemi del driver USB o del driver di conversione da USB a seriale. Ricollegare o sostituire il cavo. Reinstallare i driver opportuni. Avviare il software in Virtual Mode (Modalità virtuale) e selezionare il pulsante Setup/Auto-Detect (Impostazione/Rilevamento automatico) dal menu File per ripristinare la porta COM configurata.
Chamber lid open (Coperchio camera aperto) Could not continue run; the chamber lid was opened during a run. Please reset the machine, and restart the software (Impossibile continuare il processo; il coperchio della camera è stato aperto durante un processo. Resetare la macchina e riavviare il software).	Questo errore si verifica quando il software rileva l'apertura del coperchio nel mezzo di un processo. Ripristinare la macchina e riavviare il software.
Chamber lid open (Coperchio camera aperto) The instrument chamber lid is open. Please close the lid and then click Continue (Il coperchio della camera dello strumento è aperto. Chiudere il coperchio e fare clic su 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 fare clic su Continue (Continua).
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 i servizi tecnici QIAGEN.
Communication out of sequence (Comunicazione fuori di sequenza) Instrument has received data from the machine that is out of sequence (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 i servizi tecnici QIAGEN.
Communication protocol error (Errore del protocollo di comunicazione) A communication protocol error occurred with this run (Si è verificato un errore nel protocollo di comunicazione con questo processo).	Questo errore si verifica quando il protocollo di comunicazione configurato nel firmware non è quello previsto. 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.
Detector motor jam, stopped machine (Motore rilevatore bloccato, macchina ferma)	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. Se l'errore persiste, contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN.
Fatal hardware malfunction (Malfunzionamento fatale dell'hardware) 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 (Lo strumento ha rilevato un malfunzionamento fatale nell'hardware. Non tentare di usare nuovamente la macchina prima dell'assistenza da parte del distributore).	Questo errore si verifica quando il software rileva un malfunzionamento fatale dell'hardware e attiva una procedura di protezione di sicurezza per spegnere la macchina. Spegnere lo strumento immediatamente e contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN.

Messaggio di errore	Commenti e suggerimenti
<p>Machine error (Errore macchina)</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 (Questo processo è stato arrestato perché 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 quando il software rileva sulla macchina errori che non è stato possibile recuperare. Il software ha arrestato il processo.</p> <p>Provare un altro processo. Se il problema persiste, contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN allegando un file di archivio di supporto.</p>
<p>Machine unplugged (Macchina non collegata)</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 (Lo strumento non risponde e non è riuscito a inviare il messaggio <MESSAGGIO DI ERRORE>. Si tratta di un errore irreparabile. Ripristinare 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 le attività che impegnano il processore in modo intensivo, 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 o l'attività che impegna il processore in modo intensivo.</p> <p>Ripristinare lo strumento e riavviare il software.</p> <p>Contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN se il problema persiste.</p>
<p>Machine unplugged (Macchina non collegata)</p> <p>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 (Lo strumento non è collegato al computer su <NOME PORTA>. Ricollegare il cavo seriale sul retro del computer, quindi fare clic su Continua).</p>	<p>Questo errore si verifica quando si perde la comunicazione seriale o USB con lo strumento.</p> <p>Ricollegare il cavo seriale o USB sul retro del computer, quindi fare clic su Continue (Continua).</p>
<p>Object variable or with block variable not set (Variabile dell'oggetto o variabile con blocco non impostata)</p>	<p>Questo errore si verifica all'avvio del software se il file modello predefinito dell'esperimento è alterato. Questo può verificarsi se il software/computer sono stati arrestati senza uscire correttamente, ad esempio, per un'interruzione dell'alimentazione.</p> <p>Cancellare il file C:\Program Files\Rotor-Gene Q Software\Templates\normal.ret e riavviare il software.</p>
<p>Rotor speed failure (Errore velocità rotore)</p> <p>Time out while setting the rotor speed (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 i servizi tecnici QIAGEN.</p>
<p>Serial port in use (Porta seriale in uso)</p> <p>The serial port is currently being used by another application. Close any applications such as communications or synchronization software and then retry (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 e riprovare.</p>
<p>Shutdown timeout (Timeout durante lo spegnimento)</p> <p>The instrument has exceeded the expected time to shutdown. Please reset the machine, and reset the software (Lo strumento ha superato il tempo previsto per lo spegnimento. Ripristinare la macchina e 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>Ripristinare la macchina e riavviare il software.</p>

Messaggio di errore	Commenti e suggerimenti
<p>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 (Lo strumento ha rilevato che la temperatura della camera ha superato un livello di sicurezza. Pertanto è andato in modo auto-protezione. Spegnere lo strumento e contattare il distributore se il problema persiste).</p>	<p>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. Spegnere lo strumento immediatamente e contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN.</p>
<p>Thermistor is open (Il termistore è aperto) 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 (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).</p>	<p>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. Spegnere lo strumento immediatamente e contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN.</p>
<p>Unrecoverable errors occurred (Si è verificato un errore irrecuperabile) 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 (Questo processo è stato arrestato perché 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. Si richiedono ulteriori indagini da parte di un tecnico del servizio di assistenza tecnica QIAGEN per diagnosticare il problema. Contattare il distributore o i servizi tecnici QIAGEN.</p>

11.3.2 Messaggi del software Rotor-Gene Q

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, ad esempio, le descrizioni caratteristiche dell'errore, sono tra parentesi (ad esempio, < ERROR DESCRIPTION > (<DESCRIZIONE ERRORE>)).

Testo del messaggio

Messaggi generici

- 1 A raw channel already exists for this page. If you would like to recreate this page, you must first delete the raw channel via the Options button and then try again (Esiste già un canale grezzo per questa pagina. Se si vuole ricreare questa pagina, cancellare prima il canale grezzo mediante il pulsante Opzioni e poi riprovare).
- 2 A serious problem has occurred which requires shutting down the software. After you click OK, your current work will be saved, and the machine will be turned off, if possible. If this problem persists, please contact your distributor (Si è verificato un grave problema che richiede la chiusura del software. Dopo aver fatto clic su OK, il lavoro corrente sarà salvato e la macchina spenta, se possibile. Se il problema persiste, contattare il distributore).
- 3 Cannot delete this page. There must always be at least one sample page (Impossibile cancellare questa pagina. Deve essere sempre presente almeno una pagina campione).
- 4 Can't connect to instrument on serial port <COMPORT>. Check the machine is correctly plugged into the back of the computer, then retry (Impossibile collegare lo strumento sulla porta seriale <PORTACOM> Controllare che la macchina sia correttamente collegata sul retro del computer, poi riprovare)

Testo del messaggio

- 5 Can't open the serial port <COMPORT> to connect to the instrument. Check you do not have any communications software open, then retry (Impossibile aprire la porta seriale <PORTACOM> per connettere lo strumento. Controllare che non sia aperto nessun software di comunicazione, poi riprovare).
- 6 Could not save to run because some data on the form was invalid. Please check your entries then try again (Non è stato possibile salvare il processo perché il modulo conteneva dati non validi. Verificare i dati immessi, poi riprovare).
- 7 Couldn't save file. Confirm the disk has enough space and that it is free of errors (Impossibile salvare il file. Confermare che il disco abbia spazio a sufficienza e sia esente da errori).
- 8 E-mail application could not be started. Confirm that it has been correctly installed on your computer (Non è stato possibile aprire l'applicazione e-mail. Verificare che sia stata correttamente installata sul computer).
- 9 Encountered an error during run: <ERROR DESCRIPTION>. The run will continue, and a message will be logged in the messages tab of Run Info (Si è verificato un errore durante il processo: <DESCRIZIONE DELL'ERRORE>. Il processo continua e viene registrato nella scheda dei messaggi di Info processo).
- 10 Instrument was not detected. Please ensure you have correctly connected the instrument, and that the instrument is turned on (Strumento non rilevato. Verificare che lo strumento sia stato collegato correttamente e che sia stato acceso).
- 11 Logging is currently disabled due to a previous error. Archived logs cannot be viewed until the software has been restarted (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 Not all samples could be normalised as the fluorescent level was too low (Non è stato possibile normalizzare tutti i campioni a causa di un livello di fluorescenza troppo basso).
- 13 Only runs performed with the same rotor as the current run may be imported (Possono essere importati solo i processi eseguiti con lo stesso rotore del processo corrente).
- 14 Please note that log files for the current run will not be available until it has completed (Notare che i file log del processo corrente non saranno disponibili fino al suo completamento).
- 15 Please type valid number of times to repeat. It should be more than 0 (Immettere un numero di ripetizioni valido. Deve essere superiore a 0).
- 16 Problem encountered while updating log data. Logging has been disabled, but will be reenabled on the next run (Si sono incontrati problemi durante l'aggiornamento dei dati log. Il logging è stato disattivato, ma sarà riattivato al prossimo processo).
- 17 Run file signing ensures the integrity of your run results. Information about a run's signature can be found in the Run Info window (La firma del file di processo assicura l'integrità dei propri risultati. Le informazioni sulla firma del processo sono reperibili nella finestra Info processo).
- 18 Sample ID is locked. Cannot paste over locked samples (ID campione bloccato. Impossibile incollare su campioni bloccati).
- 19 TeeChart Office has not been installed on this computer. Please re-install the Rotor-Gene software (TeeChart Office non è installato su questo computer. Reinstallare il software Rotor-Gene).
- 20 The COM port configured for the instrument is not selected (Non è stata selezionata la porta COM configurata per lo strumento. È necessario selezionare una porta COM).
- 21 The loaded run file contains a signature which does not match the file contents. This means the file has either been corrupted, or tampered with since it was written by the Rotor-Gene software (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 The loaded run file has no signature. The contents of this file cannot be guaranteed (Il file caricato è senza firma. Non è possibile garantire il contenuto di questo file).
- 23 The Machine serial number is not valid. Serial numbers must be at least 6 digits long (Il numero di matricola della macchina non è valido. I numeri di matricola devono essere di almeno 6 cifre).
- 24 The machine will now be cooled to <TEMPERATURE> degrees. The chamber and surfaces will still be very hot when opening the machine. Please exercise due caution and wear protective gloves if touching any of the surfaces or tubes (Ora la macchina sarà fatta raffreddare fino a <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 The regional settings for your computer are conflicting. Ensure your currency and numeric decimal placeholders are matching (Le impostazioni regionali del computer usato sono in conflitto. Verificare la corrispondenza della valuta e dei separatori decimali).

Testo del messaggio

- 26 The serial number entered in the welcome screen <SERIAL NUMBER1> does not match the serial number stored in the attached machine <SERIAL NUMBER2>. The computer's serial number has now been updated to match the connected machine (Il numero di matricola immesso nella schermata di benvenuto <MATRICOLA1> non corrisponde a quello memorizzato nella macchina collegata <MATRICOLA2>. Il numero di matricola del computer ora è stato aggiornato in modo da corrispondere alla macchina collegata).
- 27 There was a problem communicating with the communication board. You should reboot the computer and then retry (si è verificato un problema di comunicazione con la scheda di comunicazione. Riavviare il computer e riprovare).
- 28 There was a timeout attempting to talk to the instrument. Check it is correctly plugged in (Si è verificato un timeout nel tentativo di dialogo con lo strumento. Verificare che sia stato collegato correttamente).
- 29 This feature cannot be used in virtual mode (Questa funzione non può essere usata in modo virtuale).
- 30 This profile file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly (Questo file profilo è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente).
- 31 This run file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the run may not load correctly (Questo file di processo è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente).
- 32 This sample file was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects may not load correctly (Questo file campione è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente).
- 33 This software will perform basic simulation of a machine for training and demonstration purposes. You can disable this setting via the Setup screen, accessible from the File menu (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 This template was created in a more recent version of the Rotor-Gene software. Certain aspects of the template may not load correctly (Questo modello è stato creato in una versione più recente del software Rotor-Gene. Alcuni aspetti potrebbero non essere caricati correttamente).
- 35 Unable to load this sample file as tube layouts do not match. Load these samples before starting the run (Impossibile caricare questo file campione perché il layout delle provette non corrisponde. Caricare questi campioni prima di iniziare il processo).
- 36 Unable to open communications with the machine because another application is already using <COMPORT>. Check you do not have any applications running that use the same serial port, then retry (Impossibile comunicare con la macchina perché un'altra applicazione sta già utilizzando <PORTACOM>. Verificare che non siano in corso applicazioni che usano la stessa porta seriale, quindi riprovare).
- 37 Unrecoverable errors were encountered while attempting to load the file. The file was not loaded (Si sono verificati errori irreversibili durante il tentativo di caricare il file. Il file non è stato caricato).
- 38 You cannot stop the program while the run is in progress (Impossibile arrestare il programma durante il processo).
- 39 You have insufficient rights to use the software. Please contact the domain administrator to set up groups (I diritti disponibili non sono sufficienti per usare il software. Contattare l'amministratore del dominio per impostare i gruppi).
- 40 You must have performed a quantitation analysis to export samples (Occorre eseguire un'analisi di quantificazione prima di esportare i campioni).
- 41 You must select a COM port before continuing (È necessario selezionare una porta COM prima di continuare).
- 42 Your run could not be saved to its default location. On the following window, select an alternative location to save your run (Non è stato possibile salvare il processo nella posizione predefinita. Nella finestra successiva, selezionare una posizione alternativa in cui salvarlo).
- 43 Your settings have been saved. Click OK to close the software (Le impostazioni sono state salvate. Fare clic su OK per chiudere il software).
- 44 You must select a rotor before continuing (È necessario selezionare un rotore prima di continuare).
- 45 You cannot start the run until you tick the checkbox to confirm that the locking ring has been attached (Non è possibile avviare il processo se non è stata selezionata la casella per confermare che l'anello di bloccaggio è stato inserito).

Testo del messaggio

Messaggi di regolazione dell'autogain

- 46 Manual gain adjustment uses the channels you have defined in your profile. As you have not defined any acquisition points in your profile, you cannot perform manual gain adjustment (La regolazione manuale del gain utilizza i canali definiti nel proprio profilo. Poiché nel profilo non sono stati definiti dei punti d'acquisizione, non è possibile eseguire la regolazione manuale del gain).
- 47 The temperature you entered was not saved because it was outside the range of the machine. Enter a valid temperature (La temperatura immessa non è stata salvata perché al di fuori del range della macchina. Immettere una temperatura valida).

Messaggi dell'editor

- 48 Please enter a valid group code. Group codes must be a maximum of 5 characters, and contain no spaces or commas (Immettere un codice di gruppo valido. I codici di gruppo devono avere un massimo di 5 caratteri, senza spazi né virgole).
- 49 Please enter a valid group name. Group names cannot contain commas or be empty (Immettere un nome di gruppo valido. I nomi di gruppo non possono contenere virgole, né essere vuoti).

Messaggi di calibrazione della denaturazione ottica

- 50 Unable to set as optical denature point due to calibration failure. Please enter a valid number of seconds to hold. It should be a positive value (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 A melt peak could not be detected during Optical Denature Calibration. This may be because the incorrect tube was selected for calibration, or that an inappropriate chemistry was used for this sample. A timed step profile was run instead (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 You must enter a valid OTV serial number to perform the run (Immettere un numero di matricola OTV valido per eseguire il processo).
- 53 This temperature verification file has been corrupted. Please uninstall and re-install the Rotor-Gene software to correct this error (Questo file di verifica della temperatura è stato alterato. Disinstallare e reinstallare il software Rotor-Gene per correggere questo errore).
- 54 This run file is not correctly signed. Results cannot be displayed (Questo file di processo non è firmato correttamente. Impossibile visualizzare i risultati).
- 55 You cannot start until you tick the checkbox to confirm that the fluorescent insert has been placed correctly (Non è possibile avviare il processo se non è stata selezionata la casella per confermare che l'inserito fluorescente è stato inserito correttamente).
- 56 This rotor has expired. Please contact your distributor to obtain a replacement (Questo rotore è scaduto. Contattare il distributore per ottenere una sostituzione).

Messaggi del menu Sicurezza

- 57 Could not open the Windows user/group manager (Impossibile aprire il manager utenti/gruppi di Windows).
- 58 Could not create groups (Impossibile creare gruppi).
- 59 Cannot modify access of inbuilt accounts (Impossibile modificare gli account incorporati).

Menu Analisi

- 60 You have only selected one channel for analysis. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window (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).
- 61 You have selected multiple channels for analysis. This analysis technique only allows single channels to be analysed (Sono stati selezionati più canali per l'analisi. Questa tecnica di analisi permette di analizzare solo canali singoli).

Messaggi di misurazione della concentrazione

- 62 Concentration Measurement performs auto-gain optimisation on the first rotor position. Ensure you have your highest concentration standard in the first rotor position (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).

Testo del messaggio

Messaggi di analisi Endpoint

- 63 To use end-point analysis you must have positive and negative controls in each channel. To define these controls click OK (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 You have not defined any positive controls. You must define positive controls for each channel you are analysing (Non è stato definito nessun controllo positivo. È necessario definire controlli positivi per ogni canale che si sta analizzando).
- 65 You have not defined any negative controls. You must define negative controls for each channel you are analysing (Non è stato definito alcun controllo negativo. È necessario definire controlli negativi per ogni canale che si sta analizzando).
- 66 You have not defined any NTC controls. You must define NTC controls for each group (Non è stato definito alcun controllo NTC. È necessario definire controlli NTC per ogni gruppo).

Messaggi analisi HRM

- 67 Genotype <GENOTYPE NAME> does not have a control defined (Per il genotipo <NOME GENOTIPO> non è stato definito un controllo).
- 68 Duplicate genotype combinations are not allowed (Non sono consentite combinazioni duplicate di genotipi).
- 69 High resolution melts are not supported on this instrument. Please contact your distributor for more information (Le fusioni ad alta risoluzione non sono supportate da questo strumento. Consigliamo di chiedere maggiori informazioni al distributore).

Messaggi di analisi di fusione

- 70 The genotypes can not be defined until bins have been placed. Please define all bins and then try again (Non è possibile definire i genotipi fino a che non siano stati assegnati i bin. Definire tutti i bin, poi riprovare).
- 71 You must enter an abbreviation for <GENOTYPE NAME> genotype (Immettere un'abbreviazione per il genotipo <NOME GENOTIPO>).

Messaggi analisi con grafico di dispersione

- 72 Scatter plot analysis requires exactly 2 channels to be selected. To select multiple channels, drag a rectangle around the channels you wish to display in the analysis selection window, or click while holding the SHIFT key on each channel (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 fare clic su ciascun canale tenendo premuto il tasto MAIUSC).

Messaggi di analisi di quantificazione

- 73 The auto-find threshold feature requires that you have defined at least 2 selected standards. To set this up, right-click on the sample list and select "Edit Samples..." (La funzione Trova soglia automaticamente richiede che siano stati definiti almeno 2 standard selezionati. Per questa impostazione, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'elenco dei campioni e selezionare "Modifica campioni...")

12 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" (Analisi).
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.
CE-IVD	Conformità con la Direttiva Europea per dispositivi medici in vitro 98/79/CE.
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 a una data lunghezza d'onda. La fluorescenza emessa dai campioni passa attraverso un filtro di emissione, prima di essere rilevata da un fotomoltiplicatore.
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 è impostato un gain troppo alto, il segnale è sovrasaturato. Se è impostato un gain 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.
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 Rotor-Disc Loading Block sono utilizzati anche con il Rotor-Disc Heat Sealer.
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.
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.
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 Rotor-Disc Heat Sealer.

13 Specifiche tecniche

QIAGEN si riserva il diritto di modificare le specifiche tecniche in qualsiasi momento.

13.1 Condizioni ambientali – condizioni operative

Potenza	100–240 V CA, 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 dell'aria	Da 18 a 30°C
Umidità relativa	10–75% (non condensante)
Altitudine	Fino a 2000 m
Ambiente operativo	Solo per uso in ambienti chiusi
Livello di inquinamento	2
Classe ambientale	3K2 (IEC 60721-3-3) 3M2 (IEC 60721-3-3)

13.2 Condizioni per il trasporto

Temperatura dell'aria	Da -25°C a 60° nella confezione originaria
Umidità relativa	Max. 75% (senza condensa)
Classe ambientale	2K2 (IEC 60721-3-2)

13.3 Condizioni per la conservazione

Temperatura dell'aria	Da 15°C a 30°C nella confezione originaria
Umidità relativa	Max. 75% (senza condensa)
Classe ambientale	1K2 (IEC 60721-3-1)

13.4 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.x (dove x è ≥ 0)

13.5 Specifiche (hardware e software)

13.5.1 Specifiche termiche

Descrizione	Specifica
Intervallo di temperatura	Da 35°C a 99°C (da 50°C a 99°C per applicazioni di ciclo)
Precisione temperatura	±0,5°C (Calibrazione effettuata mediante la procedura Rotor-Disc OTV)
Risoluzione termica	±0,02°C (incremento minimo programmabile)
Uniformità di temperatura	±0,02°C

13.5.2 Specifiche ottiche

Descrizione	Specifica
Fonti di eccitazione	Diodi ad emissione luminosa ad alta energia.
Rilevatore	Fotomoltiplicatore
Tempo di acquisizione	4 s

14 Appendice A – Informazioni legali

14.1 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 delle norme FCC: Il suo funzionamento è soggetto alle due condizioni seguenti: (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 si applica ai prodotti trattati in questo manuale, se non diversamente specificato in questo documento. La dichiarazione per gli altri prodotti sarà riportata sulla relativa documentazione.

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. Non è tuttavia possibile garantire la totale assenza di interferenze in un'installazione specifica. Qualora la presente apparecchiatura generi interferenze alla ricezione radiotelevisiva (evento che può essere accertato spegnendo e riaccendendo l'apparecchiatura), l'utente deve tentare di correggere l'interferenza eseguendo una o più operazioni tra quelle indicate di seguito:

- Cambiare l'orientamento o la posizione dell'antenna ricevente
- Aumentare la distanza tra l'apparecchiatura e il ricevitore
- Collegare l'apparecchiatura a una presa di un circuito differente da quella alla quale è collegato il ricevitore

Consultare il venditore o un tecnico radiotelevisivo competente.

14.2 Conformità allo standard IEC EN 61326

Il Rotor Gene-Q MDx è conforme ai requisiti per le emissioni di disturbi e l'immunità all'interferenza descritti negli standard IEC 61326-1 e IEC 61326-2-6.

QIAGEN GmbH Germany non è da ritenersi responsabile per eventuali interferenze radiotelevisive causate da modifiche non autorizzate del presente apparecchio oppure dalla sostituzione o dal collegamento di cavi di connessione e apparecchi diversi da quelli specificati da QIAGEN GmbH Germany. L'utente sarà responsabile di correggere le interferenze causate da tali modifiche, sostituzioni o collegamenti non autorizzati.

14.3 Dichiarazione di conformità

Nome e indirizzo del produttore legale

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
Germania

La Dichiarazione di conformità aggiornata può essere richiesta ai servizi tecnici QIAGEN.

14.4 Direttiva sullo smaltimento dei rifiuti elettrici ed elettronici (Waste Electrical and Electronic Equipment, WEEE)

Questa sezione contiene informazioni sullo smaltimento delle apparecchiature elettriche ed elettroniche a cura dell'utente.

Il simbolo del cassonetto barrato (vedi sotto) indica che questo prodotto non deve essere smaltito con altri rifiuti, ma consegnato a un'azienda di smaltimento autorizzata o a un apposito centro di raccolta per il riciclaggio nel rispetto delle normative e delle leggi 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, il riciclaggio può essere effettuato da QIAGEN a un costo supplementare. Nell'Unione Europea QIAGEN provvede al riciclaggio gratuito delle proprie apparecchiature elettroniche marchiate WEEE e di eventuali prodotti sostitutivi forniti, conformemente ai requisiti specifici WEEE.

Per riciclare le apparecchiature elettroniche, contattare l'ufficio vendite QIAGEN locale per il modulo di restituzione richiesto. Una volta inviato il modulo, si verrà contattati da QIAGEN per informazioni di follow-up al fine di organizzare il ritiro dell'apparecchiatura da smaltire o per la proposta di un'offerta individuale.

14.5 Clausola di responsabilità limitata

QIAGEN è 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 i casi in cui la società abbia dato il proprio consenso scritto a 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. Le eventuali dichiarazioni e garanzie rilasciate da chiunque, inclusi i rappresentanti di QIAGEN, che siano incoerenti o in conflitto con la presente garanzia non sono vincolanti per la società salvo accordo scritto e approvato da un funzionario QIAGEN.

14.6 Contratto di licenza del software

1. Di seguito, il termine "Qiagen" fa riferimento a Qiagen GmbH e alle società affiliate, mentre il termine "Software" indica i programmi e i dati forniti su questo supporto fisico (vale a dire CD-ROM) oppure in Internet alle condizioni indicate di seguito (se non si è sicuri di un qualsiasi aspetto del seguente accordo o in caso di domande, queste vanno inviate tramite e-mail a support@qiagen.com). Il Software e la documentazione di accompagnamento sono stati sviluppati interamente a spese private. Vengono fornite in licenza come "software per computer commerciale".

2. Licenza

La licenza non conferisce alcun titolo o proprietà del Software e non è una vendita di alcun diritto per il Software. Qiagen concede all'utente una licenza non esclusiva e non trasferibile con le modalità indicate di seguito:

2.1 L'utente può utilizzare qualsiasi numero di copie del Software all'interno dell'organizzazione purché tale software sia accessibile unicamente ai dipendenti dell'organizzazione e che l'organizzazione sia proprietaria di uno strumento Rotor-Gene Q. Rendere questo software disponibile per l'uso al di fuori dell'organizzazione costituisce una violazione del presente accordo.

2.2 L'utente può effettuare copie del Software solo se necessario ai fini di backup o quando la copia è un passaggio essenziale nell'uso autorizzato del Software. Quando si eseguono le copie, è necessario riprodurre tutti gli avvisi di copyright presenti nel Software originale. In nessuna circostanza l'utente può copiare il Software su una qualsiasi bacheca elettronica, su un sito Web in Internet o su un sistema di distribuzione pubblico o privato simile.

2.3 L'utente non può rendere disponibile il Software a qualsiasi terza parte sotto forma di regalo, prestito o noleggio.

2.4 L'utente non può integrare il Software o una qualsiasi parte di esso nei programmi o nei sistemi per computer da lui sviluppati o utilizzati.

2.5 L'utente non può utilizzare o creare in altro modo file di dati o altri file elaborati dal Software (si verificano operazioni di salvataggi durante il normale funzionamento del Software).

2.6 L'utente non può disassemblare, decodificare, effettuare la compilazione inversa, bloccare o tradurre qualsiasi parte del Software o effettuare qualsiasi tentativo di individuare il codice sorgente o gli algoritmi sottostanti del Software. L'utente non può modificare alcun file di dati o altri file inclusi nel Software (si verificano operazioni di salvataggi durante il normale funzionamento del Software).

2.7 Se si tratta di una demo o di una versione di prova del Software, l'utente dispone unicamente della licenza per l'uso ai fini della valutazione e nell'ambito delle limitazioni descritte (ad esempio, limite temporaneo, limite di esecuzioni o altri limiti). Il Software può o meno tentare di applicare tali limitazioni e la mancata riuscita dell'applicazione di suddette limitazioni non costituisce una licenza per l'utente di andare oltre le suddette limitazioni.

2.8 L'utente accetta di ottenere l'eventuale chiave di registrazione o di licenza necessaria esclusivamente da Qiagen o da un distributore autorizzato e di mantenere tale chiave strettamente confidenziale nei confronti di tutte le terze parti.

3. Risoluzione

3.1 In caso di mancato rispetto dei termini e delle condizioni della presente licenza, senza pregiudizio rispetto ad altri diritti, Qiagen può risolvere la presente licenza.

3.2 Nel giro di 7 dalla risoluzione della presente licenza, l'utente fornirà a Qiagen una lettera in cui si attesta la distruzione dell'originale e di eventuali copie del Software e la distruzione di tutte le copie di eventuali chiavi di registrazioni o di licenza. L'utente può in qualsiasi momento rescindere il presente contratto mediante notifica conferma.

4. Garanzia limitata/limitazione di responsabilità

4.1 Qiagen garantisce unicamente quanto segue:

a) Se il software viene fornito su CD, quest'ultimo è privo di difetti di materiale e manifattura se utilizzato normalmente, per un periodo di novanta giorni dalla data dell'acquisto (sostituiamo gratuitamente qualsiasi CD difettoso).

b) Se utilizzato in maniera corretta, il Software sarà conforme alla documentazione fornita con il Software o ad altre specifiche pubblicate da Qiagen, per un periodo di novanta giorni dalla data dell'acquisto.

4.2 Tutta la responsabilità di Qiagen e l'unico rimedio a cui ha diritto l'utente sarà, a scelta di Qiagen, un compenso di un valore di duecentocinquanta dollari americani (US \$250) o la sostituzione del Software che non risponde alla garanzia limitata.

4.3 FATTA ECCEZIONE DELLE GARANZIE FORNITE NELLA SEZIONE 4.1 PRECEDENTE E NELLA MISURA MASSIMA CONSENTITA DALLA LEGGE, QIAGEN NON OFFRE ALTRE GARANZIE RISPETTO AL SOFTWARE.

4.4 NELLA MISURA MASSIMA CONSENTITA DALLA LEGGE E IN NESSUNA CIRCOSTANZA, IN NESSUN CASO E IN BASE A NESSUNA TEORIA LEGALE, ATTI ILLECITI, CONTRATTO O ALTRO, QIAGEN SARÀ RESPONSABILE NEI CONFRONTI DELL'UTENTE O DI QUALSIASI ALTRA PERSONA DI EVENTUALI DANNI INDIRETTI, SPECIALI, INCIDENTALI O CONSEGUENZALI DI QUALSIASI NATURA, INCLUSI, SENZA NESSUNA LIMITAZIONE, DANNI DERIVANTI DA PERDITA DI AVVIAMENTO, INTERRUZIONE DI ATTIVITÀ, GUASTI O ANOMALIE DI FUNZIONAMENTO DEI COMPUTER OPPURE PERDITE O DANNI COMMERCIALI DI ALTRO TIPO, ANCHE NEL CASO IN CUI QIAGEN SIA STATA INFORMATA DELLA POSSIBILITÀ DEL VERIFICARSI DI TALI DANNI. IN OGNI CASO, L'INTERA RESPONSABILITÀ DI QIAGEN IN BASE AL PRESENTE ACCORDO SARÀ LIMITATA AL COSTO DELLA LICENZA PAGATO DALL'UTENTE PER IL SOFTWARE. TALE LIMITAZIONE DI RESPONSABILITÀ NON SI APPLICA ALLA RESPONSABILITÀ PER MORTE O LESIONI PERSONALI NELLA MISURA IN CUI TALE LIMITAZIONE SIA VIETATA DALLA LEGGE APPLICABILE.

15 Appendice B – Tecniche matematiche

La presente appendice descrive più dettagliatamente le tecniche matematiche applicate.

15.1 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 CT (y).

Le concentrazioni logaritmiche e i valori CT degli standard sono utilizzati per costruire un modello nella forma:

$$y = Mx + B$$

15.1.1 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.

15.1.2 Intervalli di confidenza per valori CT

Ipotizziamo che l'errore nei valori replicati CT sia lineare e normalmente distribuito.

Usiamo pertanto l'intervallo di confidenza t per un campione. Sia μ il valore medio dei valori CT di un replicato $(x_0 \dots x_{n-1})$. Allora, un intervallo di confidenza $100(1 - \alpha)\%$ per un valore CT μ 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.

16 Informazioni per gli ordini

16.1 Prodotti, accessori e prodotti di consumo Rotor-Gene Q MDx

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Rotor-Gene Q MDx 5plex	Termociclatore per real-time PCR con 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi), computer portatile, software, accessori, garanzia di 1 anno su parti di ricambio e manodopera	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore ad alta risoluzione (High Resolution Melt analyzer) a 5 canali (verde, giallo, arancio, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e manodopera	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex	Termociclatore per real-time PCR a 6 canali (blu, verde, giallo, arancio, rosso, cremisi), comprendente computer portatile, software, accessori, 1 anno di garanzia su parti e manodopera	9002042
Accessori		
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Il kit contiene: 2 confezioni di Rotor-Disc 100, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 100 Rotor e Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Da richiedere
Rotor-Disc 100 (30)	30 dischi confezionati individualmente per 3.000 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 il Rotor-Disc 100 Locking Ring	9018895
Rotor-Disc 100 Locking Ring	Per bloccare un Rotor-Disc 100 nel Rotor-Disc 100 Rotor	9018896

Prodotto	Contenuto	N. cat.
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 Rotor-Disc 72 o 100 Loading Block	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
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Il kit contiene: 3 confezioni di Rotor-Disc 72, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor e Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	Da richiedere
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 Rotor-Disc 72 Locking Ring	9018899
Rotor-Disc 72 Locking Ring	Per bloccare un Rotor-Disc 72 nel Rotor-Disc 72 Rotor	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 1.000 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 Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; richiede il Locking Ring 72-Well Rotor	9018903

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Locking Ring 72-Well Rotor	Per bloccare le Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, nel 72-Well Rotor	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 da 0,1 ml	9018901
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)	1.000 provette a parete sottile per 1.000 reazioni	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 provette a parete sottile per 10.000 reazioni	981008
36-Well Rotor	Per PCR Tubes, 0.2 ml; richiede il 36-Well Rotor Locking Ring	9018907
36-Well Rotor Locking Ring	Per bloccaggio di PCR Tubes, 0.2 ml, nel 36-Well Rotor	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, richiede Rotor-Disc 72 Rotor e Locking Ring o Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400
Rotor Holder	Supporto metallico indipendente per assemblare le provette e i Rotor-Disc nei rotori	9018908

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

17 Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R1, Febbraio 2022	Versione iniziale

Contratto di licenza limitata per Rotor-Gene Q MDx

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

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

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

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, EpiTeet®, HotStarTaq®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, Type-it® (Gruppo QIAGEN); Adobe®, Illustrator® (Adobe Systems, Inc.); Alexa Fluor®, HEX™, JOE™, Marina Blue®, ROX™, SYBR®, SYTO®, TET™, Texas Red®, VIC® (Thermo Fisher Scientific o società controllate); CAL Fluor®, Quasar® (Biosearch Technologies, Inc.); Core™, Intel® (Intel Corporation); Cy® (GE Healthcare); EvaGreen® (Biotium, Inc.); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); LC Green® (Idaho Technology, Inc.); LightCycler® (Roche Group); Symantec® (Symantec Corporation); TeeChart® (Steema Software SL); Yakima Yellow® (Nanogen, Inc.). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge. I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

TeeChartOffice: Copyright 2001-2013 di David Berneda. Tutti i diritti riservati.

Per i Paesi applicabili:

Questo termociclatore in tempo reale viene fornito in licenza secondo i diritti di brevetto degli Stati Uniti per un apparecchio o un sistema che coprono i termociclatori automatizzati con rilevatori di fluorescenza e alla ricerca di priorità al N. di serie per gli Stati Uniti 07/695,201 e rivendicazioni equivalenti nel brevetto di qualsiasi controparte di proprietà di Applied Biosystems LLC, in tutti i campi, inclusa la ricerca e lo sviluppo, tutti i campi approvati e la diagnostica in vitro umana e animale. Non vengono concessi diritti in maniera espressa, in via implicita o per esclusione ad alcun brevetto, inclusi, tra gli altri esami della nucleasi a 5' oppure a qualsiasi brevetto che richieda un reagente o un kit. Per ulteriori informazioni sull'acquisto di altri diritti, contattare il Director of Licensing presso Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

Per i paesi applicabili:

L'acquisto di questi prodotti include una licenza limitata e non trasferibile per uno o più dei brevetti degli Stati Uniti, N. 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; domande di brevetto degli Stati Uniti N. 2003-0224434 e 2006-0019253, domanda di brevetto PCT N. WO 2007/035806 e tutte le domande divisionali e di proroga e le rivendicazioni corrispondenti in brevetti e domande di brevetto all'esterno degli Stati Uniti, di proprietà della University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Evotec Biosystems GmbH, e/o Roche Diagnostics GmbH esclusivamente per la diagnostica in vitro umana o animale. Non vengono concessi diritti in maniera espressa, in via implicita o per esclusione per alcun reagente o kit, in base a qualsiasi altro brevetto o rivendicazione di brevetto di proprietà della University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., Roche Diagnostics GmbH o di qualsiasi altra parte. Questo prodotto può essere utilizzato unicamente con reagenti autorizzati come i kit e gli esami con licenza completa QIAGEN. Per informazioni sull'acquisto di licenze per applicazioni o reagenti per la diagnostica in vitro, contattare Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

HB-3090-001 02/2022 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito Web www.qiagen.com