

Aprile 2022

# Istruzioni per l'uso (Manuale) di *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit



Versione 1



Diagnostica in vitro qualitativa

Per l'uso con Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

Per l'uso con QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue Kit



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, GERMANIA



R6 1127513IT



# Indice

Uso previsto .....	5
Sommario e spiegazioni .....	6
Principio della procedura .....	7
Materiali in dotazione.....	11
Contenuto del kit .....	11
Materiali necessario ma non in dotazione.....	12
Avvertenze e precauzioni.....	14
Informazioni sulla sicurezza.....	14
Precauzioni generali.....	14
Conservazione e manipolazione dei reagenti .....	16
Raccolta dei campioni, preparazione per l'analisi e conservazione.....	17
Procedura.....	19
Protocollo: valutazione del campione di DNA.....	22
Interpretazione dei risultati (manuale) .....	35
Impostazioni del software relative all'analisi .....	35
Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni .....	36
Analisi del campione .....	39
Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS .....	45
Interpretazione dei risultati.....	61
Analisi e classificazioni delle mutazioni .....	61
Limitazioni .....	63
Caratteristiche delle prestazioni .....	64

---

Prestazioni analitiche .....	64
Cut-off .....	64
Limite del bianco .....	65
Confronto con il metodo di riferimento analitico: CRC .....	65
Confronto con il metodo di riferimento analitico: NSCLC .....	68
Limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) .....	70
DNA iniziale e linearità .....	72
Sostanze interferenti .....	77
Contaminazione crociata .....	78
Esclusività/reattività crociata .....	79
Ripetibilità e riproducibilità .....	81
Variabilità nella gestione dei campioni .....	94
Equivalenza dei metodi di acquisizione dei campioni (solo NSCLC) .....	96
Prestazioni cliniche .....	99
Guida alla risoluzione dei problemi .....	106
Avvisi generati dal software <i>therascreen</i> KRAS Assay Package .....	107
Controllo di qualità .....	113
Bibliografia .....	114
Simboli .....	117
Informazioni di contatto .....	118
Appendice 1: protocollo del <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit per la procedura manuale .....	119
Appendice 2: installazione del software <i>therascreen</i> KRAS Assay Package .....	136
Informazioni per gli ordini .....	140
Cronologia delle revisioni del documento .....	142

# Uso previsto

Il *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit è un esame real-time PCR di tipo qualitativo che consente di rilevare 7 mutazioni somatiche nei codoni 12 e 13 dell'oncogene KRAS umano utilizzando lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Il kit è destinato all'uso con DNA estratto da campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) di carcinoma coloretale (Colorectal Cancer, CRC) o di carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) ottenuti mediante resezione chirurgica, agobiopsia con ago a scatto (Core Needle Biopsy, CNB) o agoaspirato con ago sottile (Fine Needle Aspiration, FNA).

Le mutazioni somatiche nel gene KRAS sono potenziali biomarcatori predittivi della resistenza alle terapie mirate a contrastare il recettore del fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), come le terapie con panitumumab e cetuximab per il trattamento del CRC. Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è inoltre destinato a favorire l'identificazione dei pazienti con NSCLC per il trattamento con sotorasib (LUMYKRAS<sup>®</sup>) in base al risultato della mutazione KRAS G12C rilevata.

Le mutazioni somatiche nel gene KRAS possono essere anche indicate come un potenziale biomarcatore predittivo per prendere delle decisioni riguardanti il trattamento rispetto ad altre terapie per NSCLC.

Per prendere delle decisioni riguardanti la terapia, il medico deve tenere conto sia dello stato mutazionale del paziente, sia di altri fattori patologici. La decisione riguardante il trattamento per i pazienti oncologici non può essere basata unicamente sullo stato mutazionale del gene KRAS.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit non è destinato all'uso per la diagnosi del carcinoma coloretale, del carcinoma polmonare non a piccole cellule né di altre patologie.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è un dispositivo medico-diagnostico in vitro.

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

# Sommario e spiegazioni

Nei carcinomi umani vengono spesso riscontrate mutazioni nell'oncogene KRAS (1-4). Grazie all'uso delle tecnologie ARMS® (Amplification Refractory Mutation System) e Scorpions® (5, 6), il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit consente di rilevare 7 mutazioni nei codoni 12 e 13 dell'oncogene KRAS su un fondo di DNA genomico wild-type (Tabella 1). Sulla base dei dati contenuti nel database COSMIC (2015 v72), le 7 mutazioni rilevate dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit rappresentano oltre il 95% di tutte le mutazioni KRAS osservate nei pazienti CRC e oltre l'88% di quelle osservate nei pazienti NSCLC (7).

**Tabella 1. Elenco delle mutazioni e identità COSMIC**

Mutazione	Cambiamento delle basi	ID COSMIC*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

\* La fonte degli ID COSMIC è il *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Il test, caratterizzato da un'elevata specificità e sensibilità, è in grado di rilevare una percentuale bassa di DNA mutante su un fondo di DNA wild-type. A condizione che vi sia un numero sufficiente di copie di DNA, è possibile rilevare lo 0,8% di mutante in un fondo di DNA genomico wild-type.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è utilizzato in una procedura basata sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Tra i vantaggi offerti da questo kit ci sono l'elevata specificità per il target, la rapidità e l'efficienza e l'assenza di soggettività nella determinazione dei risultati.

---

# Principio della procedura

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR kit utilizza le 2 tecnologie ARMS e Scorpions per consentire la rilevazione delle mutazioni tramite real-time PCR.

## Miscela di reazione delle mutazioni

Ogni miscela di reazione utilizza un primer ARMS specifico della mutazione per amplificare il DNA mutato e successivamente un primer Scorpions per rilevare il prodotto dell'amplificazione.

## ARMS

La tecnologia ARMS realizza l'amplificazione allele specifica sfruttando la capacità della *Taq* DNA polimerasi di distinguere tra una base appaiata e una base non appaiata all'estremità in 3' di un primer per PCR. Quando il primer è perfettamente appaiato, l'amplificazione procede con la massima efficienza. Quando la base in 3' presenta un appaiamento errato, può avvenire soltanto un'amplificazione di basso livello sul fondo. Viene dunque amplificata selettivamente una sequenza mutata specifica, anche in quei campioni nei quali la maggior parte del DNA non contiene la mutazione.

## Scorpions

La tecnologia Scorpions consente di rilevare il risultato dell'amplificazione. Il termine Scorpions è utilizzato per descrivere molecole a doppia funzione che contengono un primer per PCR legato covalentemente a una sonda. Nella sonda sono incorporati il fluoroforo carbossifluoresceina (FAM™) e un quencher. Quest'ultimo ha il compito di sopprimere la fluorescenza del fluoroforo. Quando la sonda si lega all'amplicone ARMS durante la reazione PCR, il fluoroforo e il quencher si scindono determinando un aumento rilevabile della fluorescenza.

## Formato del kit

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene 8 esami:

- 1 esame di controllo (miscela reazione di controllo [CTRL])
- 7 esami di mutazione (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Le miscele delle reazioni sono duplex: contengono i reagenti marcati con FAM per rilevare i target e i reagenti marcati con HEX™ per rilevare i controlli interni. I reagenti delle miscele delle reazioni e dei controlli positivi contengono il tampone Tris EDTA, mentre il controllo positivo contiene l'RNA trasportatore Poly A.

## Esami

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit prevede una procedura suddivisa in 2 fasi: nella prima fase viene eseguito l'esame di controllo, in modo da valutare la quantità totale di DNA KRAS amplificabile in un campione; nella seconda fase vengono eseguiti gli esami di mutazione e controllo, in modo da determinare la presenza o l'assenza di DNA mutante.

## Reazione di controllo

La CTRL utilizza un primer Scorpions e un primer non marcato per amplificare una breve sequenza dell'esone 4 del gene KRAS. La reazione di controllo consente di determinare se nel campione è presente un livello di DNA amplificabile, oltre a rappresentare un fattore di cui si tiene conto nei calcoli analitici per determinare lo stato mutazionale.

## Esame di controllo

L'esame di controllo, marcato con FAM, consente di valutare la quantità totale di DNA KRAS amplificabile in un campione. L'esame di controllo amplifica una regione dell'esone 4 del gene KRAS. I primer e la sonda Scorpions sono formulati in modo tale che l'amplificazione possa avere luogo in modo indipendente da eventuali polimorfismi noti del gene KRAS.

## Esami di mutazione

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

## Controlli

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

### Controllo interno

Ogni miscela di reazione contiene un controllo interno, oltre alla reazione target. Un errore indica la possibile presenza di inibitori, che possono indurre risultati imprecisi o un possibile errore commesso dall'operatore nella fase di configurazione del processo per la provetta interessata. Se l'errore del controllo interno è causato dall'inibizione della PCR, diluendo il campione potrebbe ridursi l'effetto degli inibitori. Tuttavia in questo modo anche il DNA target viene diluito. Il kit contiene una provetta di acqua per la diluizione del campione (Dil.). È necessario diluire i campioni con l'acqua per diluizione dei campioni (Dil.).

### Controllo positivo

Per ogni seduta è necessario includere un controllo positivo nelle provette 1-5. Il *therascreen* KRAS RGQ Kit contiene un controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS, da utilizzare come template nella reazione di controllo positivo. I risultati del controllo positivo verranno valutati per confermare se il kit funziona secondo i criteri di accettabilità dichiarati.

### Controllo negativo

Per ogni seduta è necessario includere un controllo negativo senza template (No Template Control, NTC) nelle provette 9–13. Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit contiene l'acqua per NTC (No Template Control, NTC) da utilizzare come "template" per il controllo senza template. Il controllo senza template è utilizzato per valutare sia le potenziali contaminazioni durante la configurazione del processo, sia le prestazioni della reazione di controllo interno.

## Valutazione del campione

La miscela della reazione di controllo (CTRL) fornita con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit consente la valutazione del DNA KRAS totale amplificabile in un campione. L'esame di controllo amplifica una regione dell'esone 4 del gene KRAS. È consigliabile configurare i campioni con il solo esame di controllo, utilizzando il controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS e l'acqua per NTC come controllo senza template.

## Piattaforma e software

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è progettato specificamente per essere utilizzato con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Il software Rotor-Gene Q e il *therascreen* KRAS Assay Package sono disponibili per il download da Internet all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o separatamente su CD.

- Consultare Materiale necessario ma non in dotazione, pagina 12, per le versioni compatibili di software RGQ e *therascreen* KRAS Assay Package.
- Per informazioni riguardanti lo strumento, consultare il manuale utente dello strumento.
- Per ridurre al minimo gli errori di controlli e campioni, è necessario osservare scrupolosamente le linee guida delle *Istruzioni per l'uso del theascreen KRAS RGQ PCR Kit* relative al posizionamento dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM in base alle procedure di installazione e ai requisiti del sito.
- Consultare Appendice 2: installazione del software *therascreen* KRAS Assay Package, pagina 136, per istruzioni sull'installazione del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package.

La manutenzione degli strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM deve rispettare i requisiti descritti nel manuale utente dello strumento. Per informazioni riguardanti lo strumento, consultare il manuale utente.

Per informazioni riguardanti l'installazione, vedere Appendice 2: installazione del software *therascreen* KRAS Assay Package.

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Numero di catalogo				874011
Numero di preparazioni		ID provetta		24
Colore	Identificazione			Volume
Rosso	Control Reaction Mix (Miscela reazione di controllo)	1	CTRL	2 x 600 µl
Viola	12ALA Reaction Mix (Miscela reazione 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Arancione	12ASP Reaction Mix (Miscela reazione 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (Miscela reazione 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Verde	12CYS Reaction Mix (Miscela reazione 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Giallo	12SER Reaction Mix (Miscela reazione 12SER)	6	12SER	600 µl
Grigio	12VAL Reaction Mix (Miscela reazione 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Blu	13ASP Reaction Mix (Miscela reazione 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (Controllo positivo KRAS)	9	PC	250 µl
Verde menta	Taq DNA Polymerase (Taq DNA polimerasi)	Taq		80 µl
Bianco	Water for NTC (Acqua per controllo senza template)	NTC		1,9 ml
Bianco	Water for Sample Dilution (Acqua per diluizione campioni)	Dil.		1,9 ml
Manuale del therascreen KRAS RGQ PCR Kit (manuale in inglese)				1

# Materiale necessario ma non in dotazione

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

## Reagenti

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (n. cat. 56404)
- Xilene
- Etanolo (96-100%)\*

## Materiali di consumo

- Puntali per pipette sterili con filtro (per evitare contaminazioni crociate, è consigliabile utilizzare puntali per pipette dotati di barriere anti-aerosol)
- Provette sterili per microcentrifuga per la preparazione di miscele master
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps per l'uso con il rotore a 72-Well Rotor (n. cat. 981103 o 981106)

## Strumentazione

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con canali di fluorescenza per Cycling Green e Cycling Yellow (rilevazione di FAM e HEX, rispettivamente)
- Software Rotor-Gene Q versione 2.3.1 o successive con KRAS Assay Package (versione 3.0.3) installato per la rilevazione automatizzata della mutazione)

**Nota:** è possibile utilizzare il software Rotor-Gene Q senza KRAS Assay Package per la rilevazione manuale della mutazione. Vedere Appendice 1: protocollo del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per la procedura manuale.

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

- 
- Thermomixer\*, incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, blocco riscaldante o bagnomaria in grado di sostenere un'incubazione a 56°C e a 90°C
  - Centrifuga da banco† con rotore per provette da 1,5 ml
  - Vortex da banco†
  - Pipette dedicate (regolabili) per la preparazione dei campioni†
  - Pipette dedicate (regolabili) per la preparazione della miscela master PCR\*
  - Pipette dedicate (regolabili) per l'aliquotazione del DNA template\*

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

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

# Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

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

Per l'uso con QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

## Informazioni sulla sicurezza

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

## Precauzioni generali

L'utente deve sempre prestare attenzione a quanto segue quando usa il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit:

- Il test è destinato all'uso con campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- Tutte le sostanze chimiche e i materiali biologici sono potenzialmente pericolosi. I campioni dei pazienti e i campioni analitici sono potenzialmente infettivi e devono essere trattati come materiale a rischio biologico.
- Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I reagenti del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sono diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti, in quanto ciò potrebbe provocare una perdita a livello di prestazioni. Non utilizzare volumi di reazione (miscela di reazione più campione) inferiori a 25 µl.

- Tutti i reagenti del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sono formulati in modo specifico per l'uso con i test forniti nel kit.
- Tutti i reagenti forniti nel *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Non sostituire i reagenti dei *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, altrimenti le prestazioni potrebbero risentirne.
- Utilizzare soltanto la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) che viene fornita con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Non sostituirla con *Taq* DNA polimerasi di altri kit dello stesso tipo o di qualsiasi altro tipo o con *Taq* DNA polimerasi di altri fornitori.
- Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Per ridurre al minimo gli errori di controlli e campioni, è necessario osservare scrupolosamente le linee guida delle *Istruzioni per l'uso del therascreen KRAS RGQ PCR Kit*, ivi incluso, a titolo esemplificativo:
  - la corretta miscelazione dei reagenti è necessaria e deve essere garantita in ogni fase della miscelazione durante la configurazione dell'esame.
  - il posizionamento dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM secondo le procedure di installazione e i requisiti del sito.

**Nota:** prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione dei reagenti di controllo e delle miscele delle reazioni con i materiali sintetici contenuti nel reagente di controllo positivo.

**Nota:** utilizzare pipette dedicate singole per la preparazione delle miscele delle reazioni e per l'aggiunta dei reagenti di controllo positivo.

**Nota:** eseguire la preparazione e l'aliquotazione delle miscele delle reazioni in una zona del laboratorio separata dalla zona adibita all'aggiunta del controllo positivo.

**Nota:** non aprire lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM finché la seduta non è terminata.

**Nota:** non aprire le provette Rotor-Gene Q al termine della seduta.

---

**Nota:** procedere con cautela per assicurare il corretto svolgimento dei test sui campioni, con particolare attenzione all'inserimento errato dei campioni, agli errori di caricamento e agli errori di pipettamento.

## Conservazione e manipolazione dei reagenti

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit viene spedito in ghiaccio secco. Qualora uno dei componenti del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit non dovesse essere congelato alla consegna o la confezione esterna dovesse essersi aperta durante il tragitto oppure la scatola non dovesse contenere la nota di accompagnamento, il manuale o i reagenti, contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Alla consegna riporre immediatamente il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit in un congelatore termoregolato e conservarlo tra -30°C e -15°C al riparo dalla luce. Evitare di esporre alla luce diretta i primer Scorpions (e in generale tutte le molecole marcate con fluorescenza) in modo da prevenire il loro fotodecadimento e il deterioramento delle prestazioni.

Se conservato alle condizioni consigliate nella confezione originale, il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è stabile fino alla data di scadenza indicata. Evitare di scongelare e congelare ripetutamente. Non superare il numero massimo di 6 cicli di congelamento/scongelamento.

---

# Raccolta dei campioni, preparazione per l'analisi e conservazione

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

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

I campioni tumorali sono eterogenei e i dati ottenuti da un campione tumorale potrebbero non concordare con i dati ottenuti da altre sezioni dello stesso tumore. I campioni tumorali possono inoltre contenere tessuto non tumorale. È possibile che il DNA appartenente al tessuto non tumorale non contenga le mutazioni rilevate dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

## Preparazione dei campioni di tessuto

**Nota:** gli scalpellini devono essere asciutti. Non svolgere questa procedura sotto una cappa a flusso laminare o aspirante.

- Utilizzando uno scalpellino nuovo per ogni campione, raschiare il tessuto tumorale dalle sezioni e raccoglierlo in provette per microcentrifuga etichettate.

## Preparazione dei campioni di tessuto per l'estrazione del DNA da tessuto CRC

- Utilizzando materiali e metodi standard, fissare il campione di tessuto in formalina 10% neutra tamponata (Neutral Buffered Formalin, NBF) e includere il campione di tessuto in paraffina. Utilizzando un microtomo tagliare sezioni seriali di 5 µm dal blocco di paraffina e montarle su vetrini di vetro.
- Affidare a un professionista qualificato (ad esempio, un patologo) lo studio di una sezione colorata con ematossilina ed eosina (EE) per valutare il contenuto tumorale e determinare l'area. Contrassegnare il vetrino colorato per distinguere il tumore dal tessuto normale. Utilizzare sezioni seriali per l'estrazione del DNA.

- Utilizzare sezioni con un contenuto tumorale che rappresenti >20% dell'area, quindi sottoporle a trattamento senza macrodissezione (vedere sotto).
- Nel caso di sezioni con un contenuto tumorale che rappresenti ≤20% dell'area, macrodissezionare una o più sezioni. Scartare il tessuto non tumorale.
- Nel caso di sezioni che hanno un'area <4 mm<sup>2</sup>, trattare due o più sezioni in modo da aumentare l'area tumorale totale fino a 4 mm<sup>2</sup> almeno (vale per entrambi i tipi di campioni, con e senza macrodissezione). Scartare il tessuto non tumorale.
- Raschiare via la paraffina in eccesso dal tessuto utilizzando uno scalpello nuovo sterile.  
**Nota:** gli scalpelli devono essere asciutti. Non svolgere questa procedura sotto una cappa a flusso laminare o aspirante.
- Utilizzando uno scalpello nuovo per ogni campione, raschiare il tessuto tumorale dalle sezioni e raccoglierlo in provette per microcentrifuga etichettate.

## Preparazione dei campioni di tessuto per l'estrazione del DNA da tessuto NSCLC

- Utilizzando materiali e metodi standard, fissare il campione di tessuto in formalina 10% neutra tamponata e includere il campione di tessuto in paraffina. Utilizzando un microtomo tagliare sezioni seriali di 5 µm dal blocco di paraffina e montarle su vetrini di vetro.
- Affidare a un professionista qualificato (ad esempio, un patologo) lo studio di una sezione colorata con ematossilina ed eosina (EE) per valutare la presenza del tumore. Utilizzare sezioni seriali per l'estrazione del DNA.
- Raschiare via la paraffina in eccesso dal tessuto utilizzando uno scalpello nuovo sterile.
- Etichettare, gestire e conservare i campioni tumorali, i blocchi, i vetrini, i campioni di analisi e le provette per microcentrifuga in modo che siano pronti per l'estrazione in un ambiente controllato e conforme alle procedure locali.

## Conservazione dei campioni

Conservare i blocchi FFPE e i vetrini a temperatura ambiente. I vetrini possono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 4 settimane prima dell'estrazione del DNA.

Il DNA genomico può essere conservato tra 2°C e 8°C per 1 settimana dopo l'estrazione e, successivamente, tra -25°C e -15°C per un massimo di 8 settimane prima dell'uso.

## Procedura

### Estrazione del DNA per campioni CRC

Utilizzare il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n. cat. 56404) con le modifiche al protocollo descritte di seguito per purificare il DNA genomico di campioni preparati con campioni FFPE CRC.

**Nota:** il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è stato validato per l'uso di DNA estratto con QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Non utilizzare altri prodotti per l'estrazione del DNA.

Eseguire l'estrazione del DNA nel rispetto delle istruzioni contenute nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Versione 1), osservando quanto segue:

- per la preparazione dei campioni prima dell'estrazione del DNA, fare riferimento al *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit deve essere utilizzato solo manualmente.
- Non utilizzare il passaggio relativo all'RNasi descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Non utilizzare la QIAGEN Deparaffinization Solution inclusa nel QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Per la deparaffinazione utilizzare esclusivamente il metodo con xilene/etanolo descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Utilizzare etanolo di grado biologico molecolare per tutti i passaggi richiesti.\*
- Usare 1 vetrino per estrazione.

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

- La digestione con proteinasi K (passaggio 11 del *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) deve durare 1 ora.
- L'eluizione dei campioni deve avvenire in 200 µl di tampone di eluizione (Buffer ATE), proveniente dal QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

**Nota:** conservare il DNA genomico a 2–8°C per 1 settimana dopo l'estrazione e, successivamente, da -25°C a -15°C per un massimo di 8 settimane prima dell'uso.

### Estrazione del DNA per campioni NSCLC

Utilizzare il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, n. cat. 56404) con le modifiche al protocollo descritte di seguito per purificare il DNA genomico di campioni preparati con campioni FFPE NSCLC.

**Nota:** Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è stato convalidato per l'uso con DNA estratto con il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Non utilizzare altri prodotti per l'estrazione del DNA.

Eeguire l'estrazione del DNA nel rispetto delle istruzioni contenute nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, osservando quanto segue:

- Non utilizzare il passaggio relativo all'RNasi descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Non utilizzare la QIAGEN Deparaffinization Solution inclusa nel QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Per la deparaffinazione utilizzare esclusivamente il metodo con xilene/etanolo descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue*.
- Utilizzare etanolo di grado biologico molecolare per tutti i passaggi richiesti.\*
- Usare 2 sezioni di 5 µm per estrazione.
- Il QIAamp DNA FFPE Tissue Kit può essere utilizzato solo manualmente.

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

- 
- Non utilizzare il passaggio relativo all'RNasi descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
  - Non utilizzare la QIAGEN Deparaffinization Solution inclusa nel QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Per la deparaffinazione utilizzare esclusivamente il metodo con xilene/etanolo descritto nel *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
  - La digestione con proteinasi K (passaggio 11 del *Manuale del QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) deve durare 1 ora.
  - Aggiungere 60 µl di tampone di eluizione (ATE) dal QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e incubare per 2,5 minuti a temperatura ambiente.
  - Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto.
  - Aggiungere altri 60 µl di tampone di eluizione (ATE) dal QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e incubare per 2,5 minuti a temperatura ambiente.
  - Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto.

**Nota:** conservare il DNA genomico a 2–8°C per 1 settimana dopo l'estrazione e, successivamente, da -25°C a -15°C per un massimo di 8 settimane prima dell'uso.

## Protocollo: valutazione del campione di DNA

Questo protocollo consente di valutare il DNA totale amplificabile presente nei campioni, mediante l'uso del modello KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) per la valutazione automatizzata del campione.

**Nota:** per la valutazione manuale del campione, consultare Appendice 1: protocollo del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per la procedura manuale.

### Punti importanti prima di iniziare

**Nota:** la valutazione del campione di DNA non è destinata a rilevare la presenza di inibitori della PCR, poiché solo il DNA totale amplificabile in un campione viene valutato tramite la reazione di controllo.

**Nota:** è importante che per effettuare questa valutazione si utilizzi la miscela reazione di controllo nel modo descritto di seguito, invece della spettrofotometria o di altri metodi alternativi. Il DNA fortemente degradato potrebbe non amplificarsi, anche se i primer generano piccoli frammenti di DNA.

- La miscela reazione di controllo (provetta CTRL) disponibile è sufficiente per valutare 24 campioni al massimo.
- Utilizzare la miscela CTRL per valutare il DNA prima dell'analisi mediante l'esame di valutazione delle mutazioni.
- Per un utilizzo efficiente dei reagenti nel *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, è consigliabile raggruppare il più possibile i campioni di DNA in batch e formare sedute complete. Analizzando i campioni singolarmente o a piccoli gruppi si consuma una maggiore quantità di reagenti e, conseguentemente, si riduce il numero di campioni che complessivamente possono essere analizzati con un unico *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Non agitare in vortex la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) o qualsiasi miscela contenente *Taq* DNA polimerasi, in quanto l'enzima potrebbe inattivarsi.

- 
- Pipettare la *Taq* DNA polimerasi inserendo delicatamente il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, per evitare che il puntale si cosparga di enzima in eccesso.
  - Per ridurre al minimo gli errori dei controlli, è necessario osservare scrupolosamente le linee guida delle *Istruzioni per l'uso del theascreen KRAS RGQ PCR Kit* relative alla corretta miscelazione dei reagenti che deve essere garantita in ogni fase della miscelazione durante la configurazione dell'esame.

### Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Assicurarsi che sia installato il software Rotor-Gene Q *theascreen* KRAS Assay Package corrispondente alla versione del software Rotor-Gene Q, prima di utilizzare per la prima volta lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (vedere Appendice 2: installazione del software *theascreen* KRAS Assay Package).
- Prima di ogni uso, è necessario lasciare scongelare tutti i reagenti per almeno 1 ora a temperatura ambiente (15-25°C), quindi miscelare capovolgendo ogni provetta per 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta. La corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.
- Prima di ogni uso, assicurarsi che la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) abbia raggiunto la temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugare brevemente la provetta affinché l'enzima si depositi sul fondo.

## Procedura

1. Lasciare scongelare completamente a temperatura ambiente (15-25°C) per almeno 1 ora la miscela di reazione di controllo (provetta CTRL), l'acqua priva di nucleasi per il controllo senza template (No Template Control, NTC) e il controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS.

I tempi per lo scongelamento dei reagenti, l'allestimento della PCR e la conservazione prima dell'avvio della seduta sono indicati nella Tabella 2.

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

Tempo di scongelamento		Temperatura di conservazione* dopo allestimento PCR	Tempi massimi per allestimento PCR e conservazione
Minimo	Massimo		
1 ora	4,5 ore	Temperatura ambiente (15-30°C)	7 ore
1 ora	4,5 ore	2-8°C	18 ore

\* Il termine "conservazione" si riferisce al tempo compreso tra il completamento dell'allestimento PCR e l'inizio della seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Nota:** l'allestimento della PCR deve avvenire a temperatura ambiente.

2. Miscelare i reagenti scongelati capovolgendo ogni provetta 10 volte per prevenire concentrazioni localizzate di sali, quindi centrifugare brevemente per far depositare il contenuto sul fondo della provetta.

**Nota:** non agitare in vortex la Taq DNA polimerasi (Taq) o qualsiasi miscela contenente Taq, in quanto l'enzima potrebbe inattivarsi.

**Nota:** La corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

3. Preparare miscele master sufficienti (miscela della reazione di controllo [CTRL] più Taq DNA polimerasi [Taq]) facendo riferimento ai volumi indicati nella Tabella 3 per:

- tutti i campioni di DNA
- 1 reazione di controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS
- 1 reazione di acqua priva di nucleasi per il controllo senza template (No Template Control, NTC)
- 1 campione extra, per fornire una quantità più che sufficiente per l'allestimento PCR

La miscela master mix per l'esame di controllo contiene tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del campione.

**Tabella 3. Preparazione della miscela master per l'esame di controllo**

Componente	Volume
Miscela reazione di controllo (CTRL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n+1)^*$
Taq DNA polimerasi (Taq)	0,24 $\mu\text{l} \times (n+1)^*$
Volume totale	20 $\mu\text{l}$ /reazione

\* n = numero di reazioni (campioni più controlli).

Preparare le miscele master in quantità sufficiente per un campione extra (n+1), in modo da avere a disposizione un'eccedenza per l'allestimento PCR. Il valore n non deve superare 24 (più i controlli), in quanto 24 è il numero massimo di campioni che possono essere inclusi in una seduta.

**Nota:** durante la preparazione della miscela master, dapprima viene aggiunto nella provetta il volume richiesto di miscela CTRL e in ultimo viene aggiunta la Taq DNA polimerasi (Taq).

**Nota:** pipettare la Taq DNA polimerasi inserendo delicatamente il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, per evitare che il puntale si cosparga di enzima in eccesso.

4. Caricare il numero necessario di strisce di 4 provette per PCR (ogni striscia ha 4 provette) sul blocco di caricamento in base alla disposizione illustrata nella Tabella 4. Non tappare le provette.

**Nota:** lasciare i tappi nel contenitore di plastica finché non servono.

**Tabella 4. Disposizione della seduta sul blocco di caricamento per la valutazione dei campioni di DNA**

Esame									
Controllo	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
Controllo	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
Controllo	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Controllo	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Controllo	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Controllo	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Controllo	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Controllo	8	16	24	-	-	-	-	-	-

\* I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.

5. Impostare una pipetta su un volume inferiore rispetto al volume totale della miscela master della reazione, quindi miscelare con cura aspirando completamente in su e in giù per 10 volte.

**Nota:** La corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

6. Aggiungere immediatamente 20 µl di miscela master mix in ogni provetta della striscia per PCR.

**Nota:** per conoscere la disposizione delle provette, vedere la Tabella 4. Per la valutazione del campione di DNA, la miscela master per l'esame di controllo deve essere aggiunta a una provetta PC, una provetta NTC e una provetta per ogni campione di DNA.

7. Aggiungere immediatamente 5 µl di acqua priva di nucleasi per controllo senza template (No Template Control, NTC) nella provetta NTC (posizione provetta 2) e chiudere con il tappo.

8. Aggiungere 5 µl di ogni campione di DNA nelle provette dei campioni (posizioni provette 3-26) e chiudere con i tappi.

9. Aggiungere 5 µl di controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS nella provetta PC (posizione provetta 1) e chiudere con il tappo.

**Nota:** Ogni provetta dovrebbe contenere un volume della reazione totale pari a 25 µl (20 µl di miscela master preparati nella Tabella 3, più 5 µl di NTC/campione/PC).

10. Con un pennarello indelebile contrassegnare i tappi delle prime provette nella posizione numerica più bassa di ogni striscia di 4 provette per PCR (vale a dire le posizioni 1, 5, 9 e così via) per mostrare l'orientamento con cui devono essere caricate le provette sul rotore a 72 pozzetti dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

11. Capovolgere 4 volte le provette tappate per miscelare il campione e la miscela della reazione.

**Nota:** La corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

12. Inserire tutte le strisce di 4 provette per PCR nelle posizioni corrette del rotore a 72 pozzetti, rispettando la disposizione della seduta (Tabella 4) e seguendo i segni di orientamento.

**Nota:** se il rotore non è completamente pieno, è necessario occupare tutte le posizioni libere del rotore con una provetta vuota tappata. In tal modo viene mantenuta l'efficienza termica dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

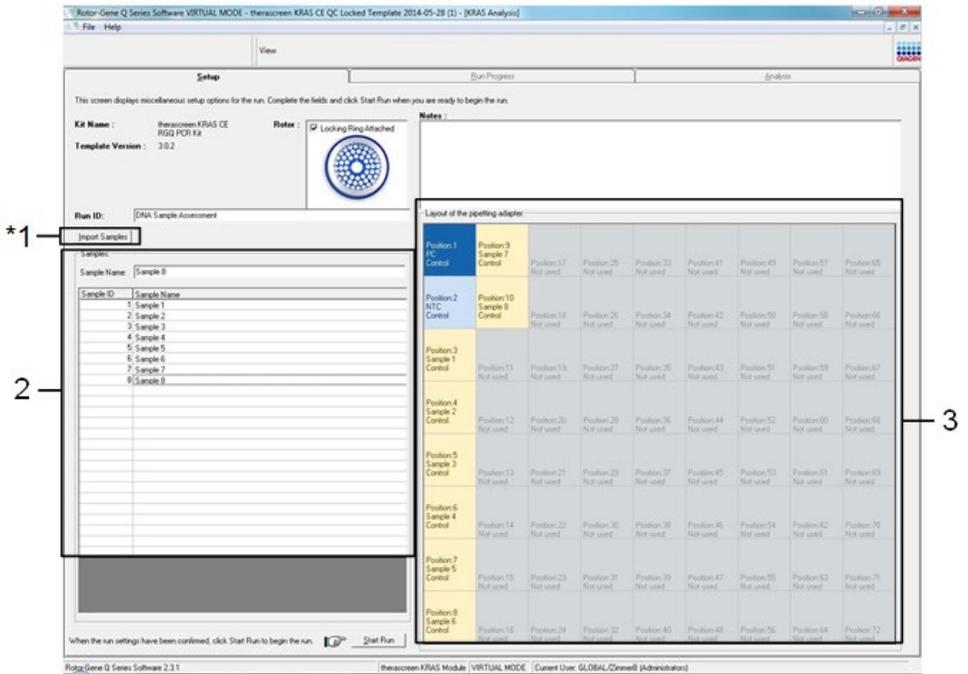
13. Caricare il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Assicurarsi che l'anello di bloccaggio (fornito con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) sia posizionato sopra al rotore, in modo da tenere ferme le provette durante la seduta.

14. Fare doppio clic sull'icona *therascreen* KRAS QC Locked Template (Modello bloccato QC *therascreen* KRAS), sul desktop del computer collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Figura 1) per avviare il software Rotor Gene Q.



Figura 1. L'icona "therascreen KRAS QC Locked Template" (Modello bloccato QC *therascreen* KRAS).

La scheda Setup (Configurazione) viene visualizzata per impostazione predefinita (Figura 2).



**Figura 2. La scheda "Setup" (Configurazione) e la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato).**  
 1 = scheda "Setup" (Configurazione); 2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato).

15. Verificare che l'anello di bloccaggio sia posizionato correttamente e selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato). Chiudere il coperchio dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Immettere l'ID della seduta nel campo "Run ID" (ID seduta) in base alle convenzioni di denominazione locali. Immettere il nome del campione nel campo "Sample Name" (Nome campione) in base alle convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto Return (Invio).

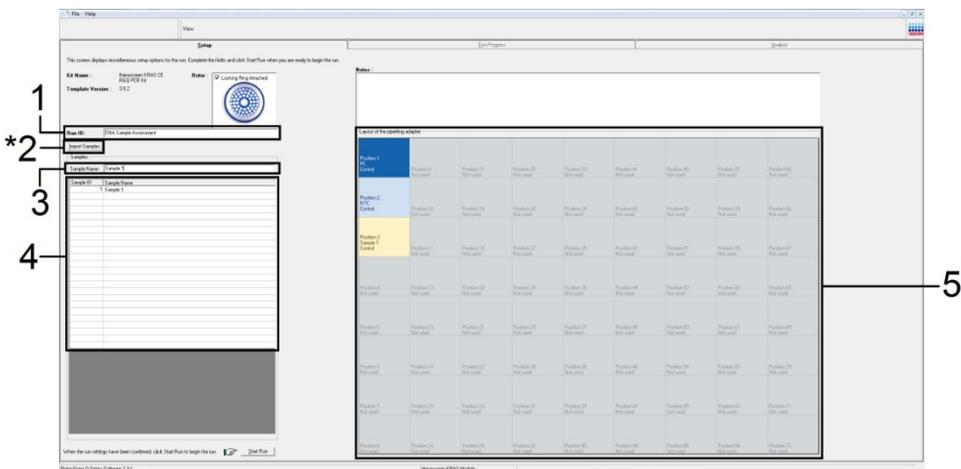
Il nome del campione verrà aggiunto all'elenco dei campioni in basso e al campione verrà assegnato un "Sample ID" (ID campione) del tipo 1, 2, 3 e così via. Inoltre il riquadro "Layout

of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) sul lato destro verrà aggiornato in modo da includere il nome del campione (Figura 3).

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

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

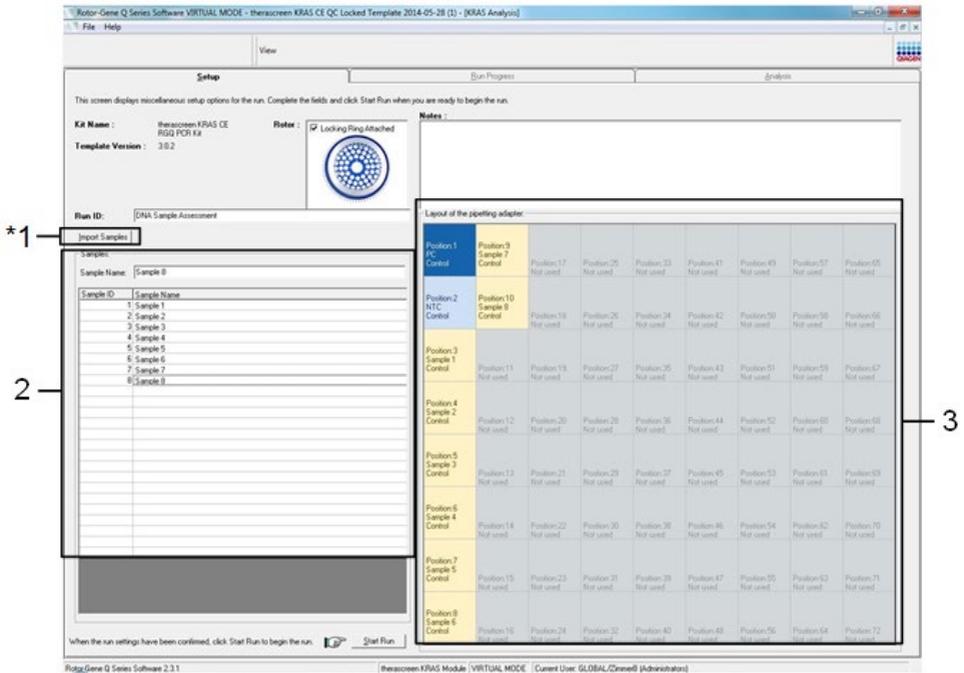
**Nota:** i campioni i cui nomi sono composti da più di 8 caratteri potrebbero non essere visualizzati per intero nel riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento).



**Figura 3.** Immissione dei valori nei campi "Run ID" (ID seduta) e "Sample Name" (Nome campione). 1 = campo "Run ID" (ID seduta), 2 = pulsante "Import Sample" (Importa campione) 3 = campo "Sample Name" (Nome campione), 4 = elenco campioni, 5 = riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento).

17. Ripetere il passaggio 16 per immettere i nomi di tutti gli altri campioni (Figura 4).

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



**Figura 4. Immissione di altri nomi di campioni nel campo "Sample Name" (Nome campione).** \*1 = pulsante "Import Sample" (Importa campione); 2 = campo "Sample Name" (Nome campione) e "Sample List" (Elenco campioni); 3 = riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) con ulteriori nomi di campioni.

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

**Nota:** se qualche posizione del rotore è inutilizzata, viene visualizzato un messaggio "Warning" (Avvertenza) (Figura 5 e Figura 6) per ricordare all'utente che è necessario occupare tutte le posizioni del rotore, eventualmente con una provetta vuota tappata. Assicurarsi che tutte le posizioni del rotore prima inutilizzate siano ora occupate con una provetta vuota tappata, quindi fare clic su OK per proseguire.

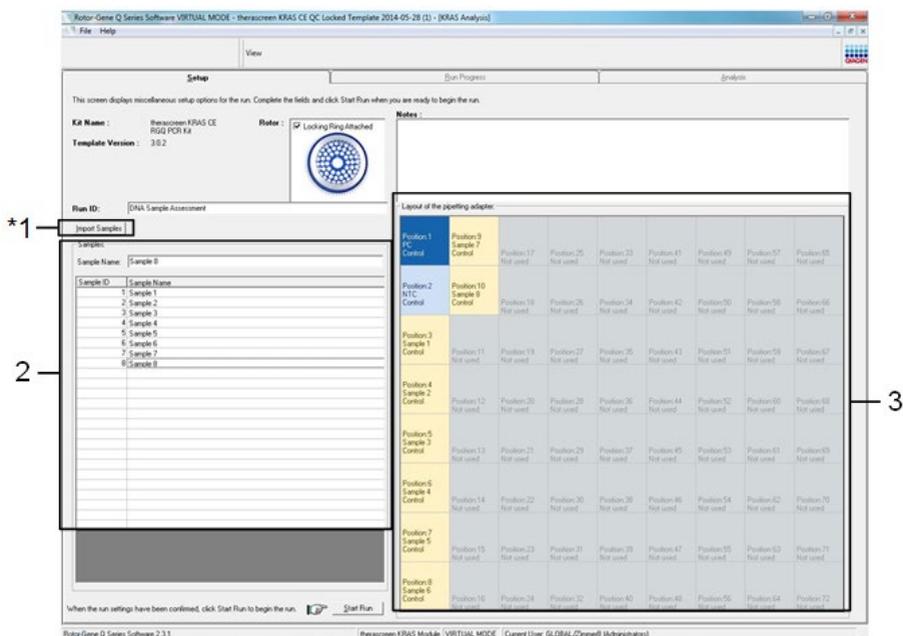


Figura 5. Campo "Notes" (Annotazioni), pulsante "Start Run" (Avvia seduta) e messaggio "Warning" (Avvertenza) per le posizioni del rotore inutilizzate.

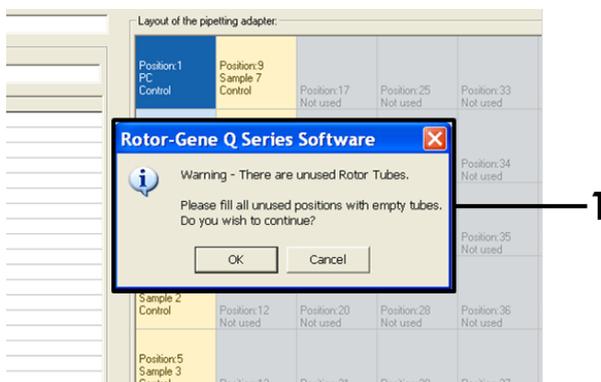


Figura 6. 1 = "Warning" (Avvertenza) relativa alle posizioni del rotore inutilizzate.

19. Si apre un campo Save As (Salva con nome). Scegliere un nome file adeguato e salvare la seduta PCR con l'estensione \*.rex nel percorso selezionato. Fare clic su Save (Salva) (Figura 7).

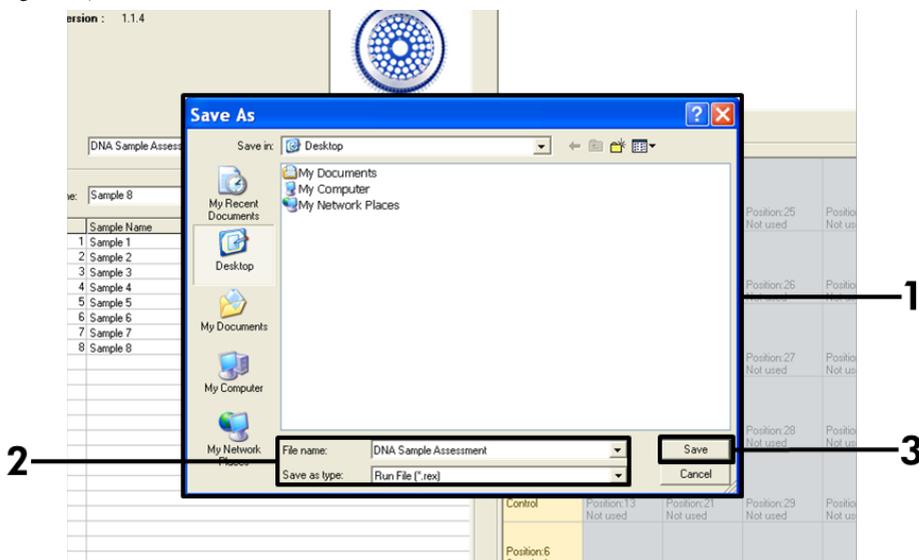
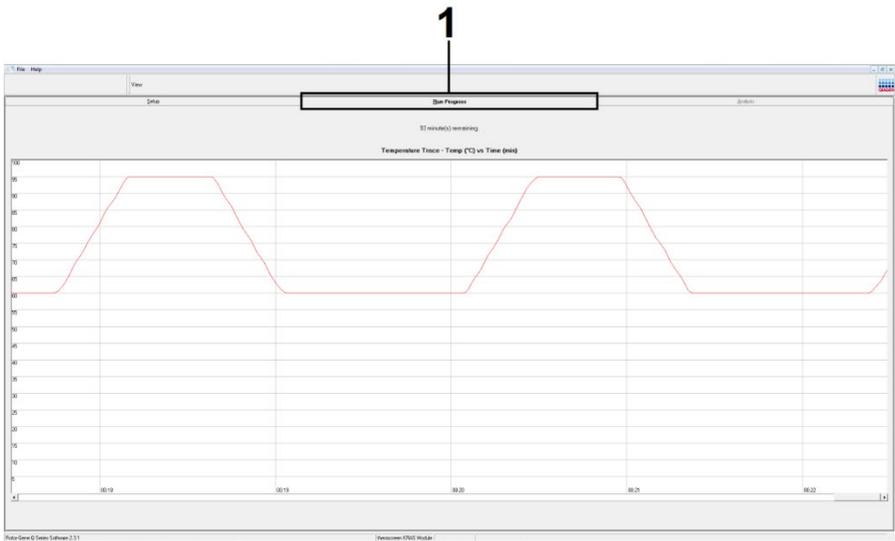


Figura 7. Salvataggio del file della seduta. 1 = finestra "Save As" (Salva con nome); 2 = nome file e tipo file \*.rex; 3 = pulsante "Save" (Salva).

La seduta PCR viene avviata.

**Nota:** quando la seduta ha inizio, si apre automaticamente la scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta) per mostrare il tracciato della temperatura e il tempo rimanente per la seduta (Figura 8).



**Figura 8. Scheda Run Progress (Avanzamento seduta).**

Quando la seduta si conclude, si apre automaticamente la scheda "Analysis" (Analisi).

**Nota:** se ciò non avviene automaticamente, fare clic sulla scheda "Analysis" (Analisi) (Figura 9).

**Nota:** una spiegazione del metodo di calcolo viene fornita in "Interpretazione dei risultati".

The screenshot shows a software window with a menu bar (File, Help) and a toolbar (View, Report). The main area is titled 'Analysis' and contains a table with the following data:

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	29.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	29.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.68	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771084B	29.09	-	Valid
17	03771085B	29.91	-	Valid
18	03771087B	30.33	-	Valid
19	03771088B	30.22	-	Valid
20	03771090B	27.17	-	Valid
21	03771090B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771095B	29.57	-	Valid
25	03771094B	29.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Figura 9. La scheda "Analysis" (Analisi) e i risultati riportati. 1 = scheda "Analysis" (Analisi), 2 = "Sample QC Result Table" (Tabella risultati QC campioni).

**Nota:** i risultati dei controlli verranno riportati nel modo seguente nella tabella "Sample QC Result Table" (Tabella risultati QC campioni) (2 nella Figura 9).

- Controlli della seduta (PC e NTC, rispettivamente posizioni 1 e 2 delle provette): se i risultati rientrano nei limiti di accettabilità, ciascuno avrà la dicitura "Valid" (Valido). In caso contrario il risultato sarà "Invalid" (Non valido).
- Reazione di controllo del campione  $C_T > 32,00$ : il risultato sarà "Invalid" (Non valido). La quantità di DNA è insufficiente per l'analisi mutazionale. Ripetere il test sul campione. Se la quantità di DNA è ancora insufficiente, estrarre altro tessuto tumorale, se disponibile (vedere "Interpretazione dei risultati (manuale)").

---

# Interpretazione dei risultati (manuale)

Al termine della seduta di valutazione del campione o di analisi della mutazione, è possibile analizzare i dati in base alla procedura seguente.

## Impostazioni del software relative all'analisi

1. Aprire il file desiderato utilizzando il software Rotor-Gene Q serie 2.3.
2. Se i campioni non sono già stati nominati prima di eseguire la seduta, fare clic su Edit Samples (Modifica campioni).
3. Inserire i nomi dei campioni nella colonna Name (Nome).
4. Fare clic su Analysis (Analisi). Nella pagina dell'analisi fare clic su Cycling A. Yellow per visualizzare il canale HEX.
5. Fare clic su Named On (Nominati).  
**Nota:** in questo modo i pozzetti vuoti non rientrano nell'analisi.
6. Selezionare Dynamic tube (Provetta dinamica).
7. Selezionare Linear scale (Scala lineare).
8. Fare clic su Outlier Removal (Rimozione valori erratici) e inserire 10% nel campo NTC Threshold (Soglia NTC).
9. Impostare 0.05 (0,05) per la soglia e controllare i valori CT HEX.
10. Nella pagina dell'analisi fare clic su Cycling A. Green per visualizzare il canale FAM.
11. Verificare che sia evidenziata l'opzione Dynamic Tube (Provetta dinamica). Fare clic su Linear scale (Scala lineare).
12. Fare clic su Outlier Removal (Rimozione valori erratici) e inserire 10% nel campo NTC Threshold (Soglia NTC).
13. Impostare 0.05 (0,05) per la soglia e controllare i valori CT FAM.

## Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni

### Analisi dei controlli della seduta

Fare riferimento al diagramma di flusso per l'analisi dei controlli nella seduta alla Figura 42.

- **Controllo negativo:** per confermare la totale assenza di contaminazione della miscela di reazione, il controllo senza templatato non deve generare un valore  $C_T$  inferiore a 40 nel canale verde. Per essere certi che la piastra sia stata allestita correttamente, l'amplificazione del controllo NTC deve essere compresa tra 31,91 e 35,16 nel canale giallo. I valori specificati sono compresi in questo intervallo.
- **Controllo positivo:** il controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS deve necessariamente generare un valore  $C_T$  compreso tra 23,5 e 29,5 nel canale verde per ciascuno degli 8 esami. I valori specificati sono compresi in questo intervallo. Un valore che non rientra in questo intervallo può essere sintomo di un problema di configurazione dell'esame e causare quindi una seduta errata.

**Nota:** non utilizzare i dati dei campioni se uno di questi due controlli della seduta fallisce. Posto che entrambi i controlli della seduta siano validi, il valore  $C_T$  di ogni campione deve rientrare nell'intervallo 21,92-32,00 nel canale verde. Se il campione non rientra in questo intervallo di valori, attenersi alle indicazioni seguenti.

### Analisi dei campioni: esame di controllo

- **Valore  $C_T$  dell'esame di controllo del campione  $<21,92$ :** è necessario diluire i campioni con un valore  $C_T$  del controllo di  $<21,92$ , poiché questo valore rappresenta il limite minimo dell'intervallo valido dell'esame. Per rilevare ogni mutazione a un livello basso, i campioni troppo concentrati devono essere diluiti in modo da rientrare nell'intervallo di valori indicato, tenendo presente che diluendo della metà si aumenterà il  $C_T$  di 1. Se il campione è vicino al valore di 21,92, è consigliabile eseguire la diluizione per ottenere un risultato dalla seduta analitica (individuazione delle mutazioni KRAS) del campione. I campioni devono essere diluiti con l'acqua fornita nel kit (acqua priva di nucleasi per diluizione [Dil.]).

- Valore  $C_T$  dell'esame di controllo del campione  $>32$ : è consigliabile ripetere l'estrazione del campione, in quanto il DNA template iniziale non è sufficiente per rilevare tutte le mutazioni ai valori di cut-off indicati per l'esame.

## Analisi della rilevazione della mutazione KRAS

### Analisi dei controlli della seduta

Consultare il diagramma di flusso per l'analisi dei controlli nella seduta (Figura 10).

- **Controllo negativo:** per confermare la totale assenza di contaminazione della miscela di reazione, il controllo senza template non deve generare un valore  $C_T$  inferiore a 40 nel canale verde. Per essere certi che la piastra sia stata allestita correttamente, l'amplificazione del controllo NTC deve essere compresa tra 31,91 e 35,16 nel canale giallo. I valori specificati sono compresi in questo intervallo.
- **Controllo positivo:** il controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS deve necessariamente generare un valore  $C_T$  compreso tra 23,5 e 29,5 nel canale verde per ciascuno degli 8 esami. I valori specificati sono compresi in questo intervallo. Un valore che non rientra in questo intervallo può essere sintomo di un problema di configurazione dell'esame e causare quindi una seduta errata.
- **Nota:** in caso di fallimento di questi 2 controlli della seduta, i dati dei campioni non devono essere utilizzati.

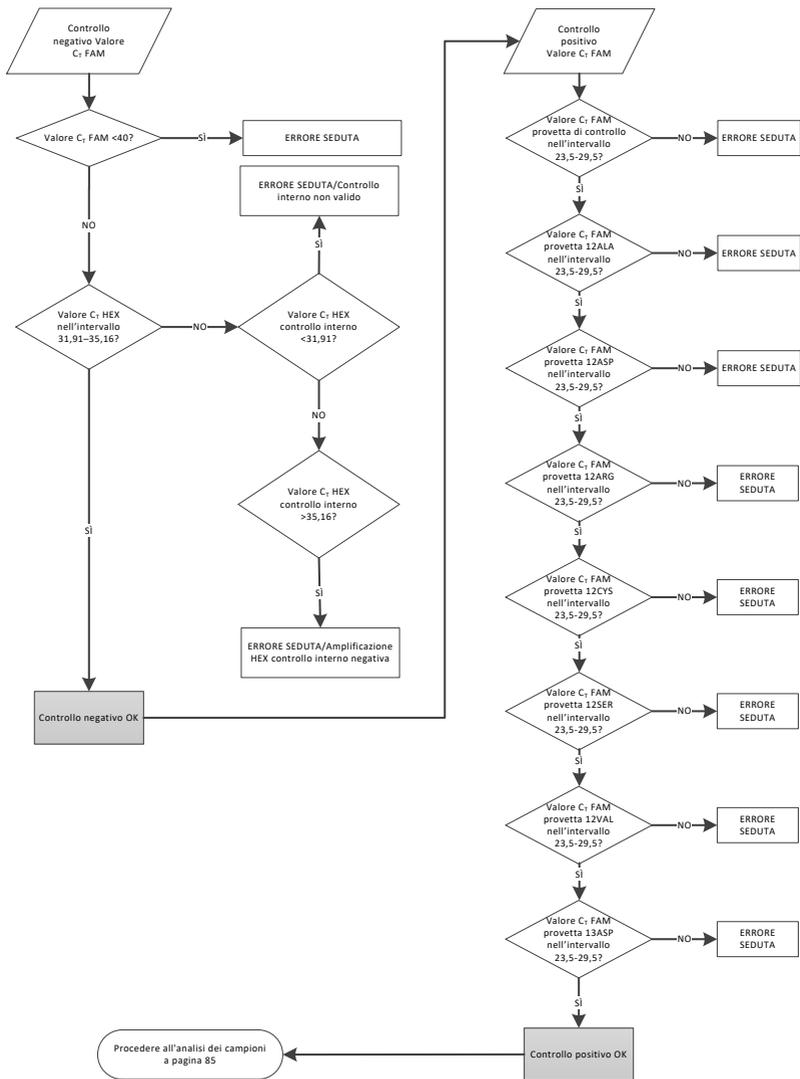


Figura 10. Diagramma di flusso per l'analisi dei controlli della seduta.

---

## Analisi del campione

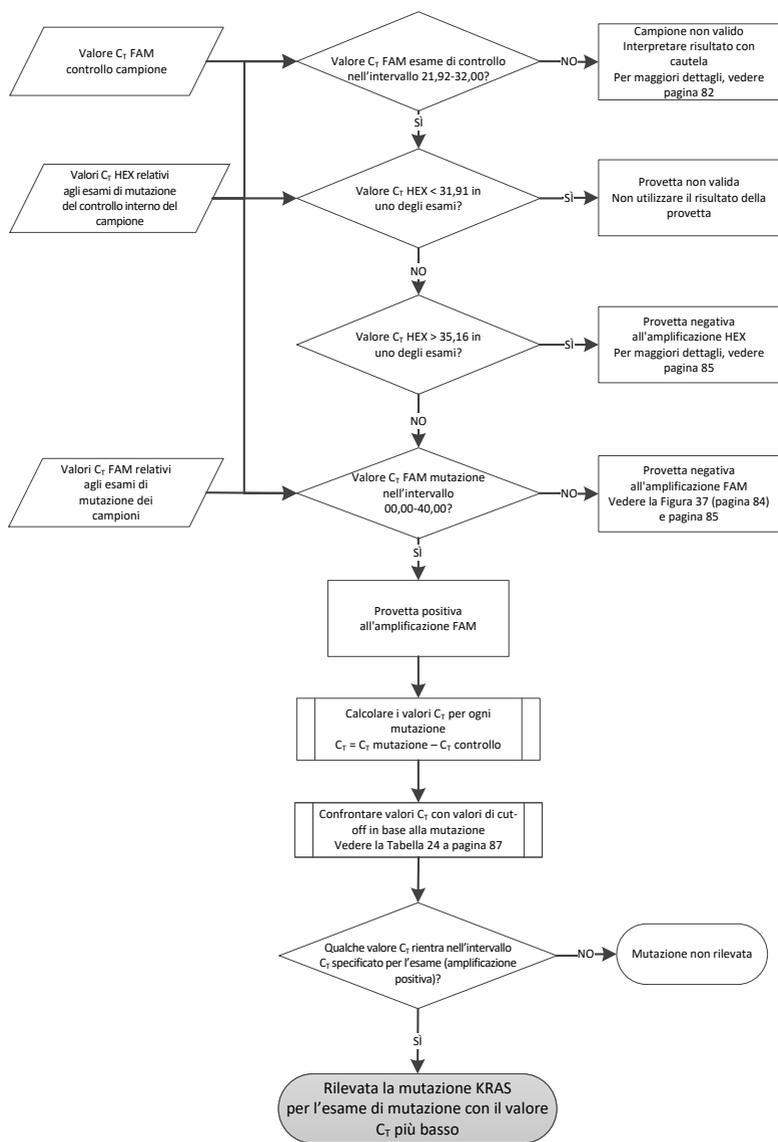
Consultare il diagramma di flusso per l'analisi dei campioni alla Figura 11.

### Valore $C_T$ FAM del controllo campione

Posto che entrambi i controlli della seduta siano validi per l'esame di controllo, il valore  $C_T$  di ogni controllo del campione deve essere compreso nell'intervallo 21,92-32,00 nel canale verde.

Se il campione non rientra in questo intervallo di valori, attenersi alle indicazioni seguenti.

- Valore  $C_T$  dell'esame di controllo del campione  $<21,92$ : i campioni con un valore  $C_T$  di controllo  $< 21,92$  determineranno un sovraccarico per gli esami di mutazione, pertanto devono essere diluiti. Per rilevare ogni mutazione a un livello basso, i campioni troppo concentrati devono essere diluiti in modo da rientrare nell'intervallo di valori indicato, tenendo presente che diluendo della metà si aumenterà il  $C_T$  di 1. I campioni devono essere diluiti con l'acqua fornita nel kit (acqua priva di nucleasi per diluizione [Dil.]).
- Valore  $C_T$  dell'esame di controllo del campione  $>32$ : interpretare i dati con cautela, poiché le mutazioni di livello molto basso potrebbero non essere rilevate.



**Figura 11. Diagramma di flusso per l'analisi dei campioni.**

Valore CT HEX relativo agli esami di mutazione del controllo interno del campione

Consultare il diagramma di flusso per l'analisi dei campioni alla Figura 11.

È necessario analizzare tutti i pozzetti di ogni campione. Assicurarsi che ogni pozzetto generi un segnale HEX dal controllo interno. I possibili scenari sono 3.

- Se il valore  $C_T$  del controllo interno rientra nell'intervallo specificato (31,91-35,16), il risultato è positivo all'amplificazione HEX.
- Se il valore  $C_T$  del controllo interno è maggiore dell'intervallo specificato (>35,16), il risultato è negativo all'amplificazione HEX.
- Se il valore  $C_T$  del controllo interno è minore dell'intervallo specificato (<31,91), il risultato non è valido.
- Se l'errore del controllo interno è dovuto all'inibizione della PCR, diluendo il campione è possibile ridurre l'effetto degli inibitori, tenendo tuttavia presente che in questo modo viene diluito anche il DNA target. Il kit contiene inoltre una provetta di acqua per la diluizione del campione (Dil.).

Valore CT FAM relativo agli esami di mutazione dei campioni

È necessario confrontare i valori FAM di tutte e 7 le miscele di reazione con i valori riportati nella Tabella 5.

**Tabella 5: Valori accettabili per la reazione di mutazione nel campione (FAM)\***

Esame	Intervallo $C_T$ accettabile	Intervallo $\Delta C_T$
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

\* I valori accettabili sono compresi in questo intervallo.

- Se il valore CT FAM rientra nell'intervallo specificato, il risultato è positivo all'amplificazione FAM.
- Se il valore CT FAM è al di sopra dell'intervallo specificato o non c'è amplificazione, il risultato è negativo all'amplificazione FAM.
- Calcolare nel modo seguente il valore DCT per ogni provetta di mutazione positiva all'amplificazione FAM, verificando che i valori CT relativi alla mutazione e al controllo provengano dallo stesso campione.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutazione} - C_T \text{ controllo}$$

Confrontare il valore  $\Delta C_T$  per il campione con il punto di cut-off per l'esame eseguito (Tabella 22), verificando che ad ogni esame venga applicato il punto di cut-off corretto.

Il punto di cut-off è il punto al di sopra del quale potrebbe collocarsi un potenziale segnale positivo causato dal segnale di fondo del primer ARMS su DNA wild-type. Se il valore  $\Delta C_T$  del campione è più alto del punto di cut-off, il campione viene classificato come negativo o al di sopra dei limiti di sensibilità del kit.

Per ciascun campione, a ogni reazione di mutazione verrà assegnato uno stato di "Mutation detected" (Mutazione rilevata), "Mutation not detected" (Mutazione non rilevata), oppure "Invalid" (Non valido) sulla base dei criteri seguenti:

Mutazione rilevata:

- Risultato positivo all'amplificazione FAM e DCT minori o uguali al valore di cut-off. Se vengono rilevate più mutazioni, dovrà essere segnalata la mutazione con il valore DCT più basso.

Mutazione non rilevata:

- Risultato positivo all'amplificazione FAM e DCT maggiori del valore di cut-off.
- Risultato negativo all'amplificazione FAM e positivo all'amplificazione HEX (controllo interno).

Non valido:

- HEX (controllo interno) è non valido.
- Risultato negativo all'amplificazione FAM e negativo all'amplificazione HEX.

---

Se un campione è negativo all'amplificazione HEX in una provetta ma positivo all'amplificazione FAM in un'altra provetta, è comunque possibile considerare valido un risultato "mutation detected" (mutazione rilevata) nella seconda provetta, ma potrebbe essere inattendibile l'assegnazione della mutazione specifica rilevata.

- Se un campione è negativo all'amplificazione HEX e positivo all'amplificazione FAM nella stessa provetta, il risultato "mutation detected" (mutazione rilevata) dovrebbe essere considerato valido.
- Se una provetta genera un'amplificazione HEX (controllo interno) non valida, il risultato di tale provetta non può essere utilizzato.

### Assegnazione dello stato mutazionale del campione

Dopo la valutazione di tutte le provette di reazione delle mutazioni, lo stato mutazionale del campione viene determinato nel seguente modo:

- Mutazione rilevata: il campione è positivo a una o più reazioni di mutazione tra le 7 ricercate. Se vengono rilevate più mutazioni, dovrà essere segnalata la mutazione con il valore DCT più basso.
- Mutazione non rilevata: il campione è negativo a tutte e 7 le reazioni di mutazione.
- Non valido: il campione non è positivo a nessuna reazione di mutazione oppure una o più reazioni di mutazione sono risultate non valide.

**Nota:** il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è destinato alla rilevazione delle mutazioni nel gene KRAS in un campione di DNA. Quando ad un campione viene assegnato un risultato positivo alla mutazione KRAS, viene segnalata una sola mutazione specifica. Se vengono rilevate più mutazioni, dovrebbe essere segnalata la mutazione con il valore  $\Delta C_T$  più basso.

È possibile che si verifichi una certa reattività crociata tra le reazioni delle mutazioni. Ad esempio, con una mutazione 12ALA di alto livello è possibile che anche altre reazioni generino un risultato positivo. Ciò è dovuto ai primer ARMS, che rilevano altre mutazioni di una sequenza simile all'altra. Se un secondo esame di mutazione genera un risultato positivo, è probabile che si tratti di reattività crociata. I casi di doppi mutanti osservati sono molto rari.

---

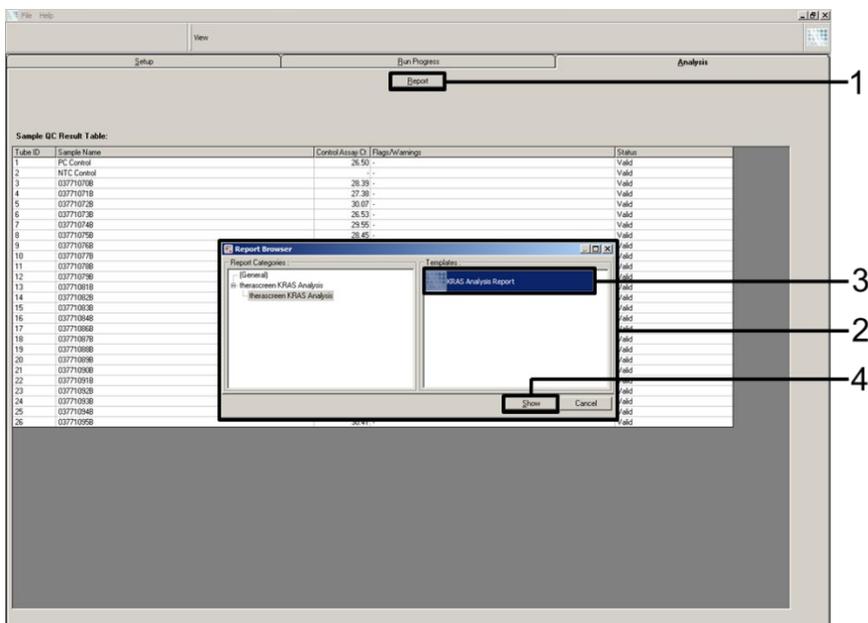
Se una o più reazioni delle mutazioni non è valida o positiva, è possibile classificare comunque il campione come positivo alla mutazione KRAS, poiché è sicuramente presente una mutazione. Tuttavia, la mutazione specifica che viene segnalata potrebbe non essere accurata e potrebbe essere causata dalla reattività crociata. Di conseguenza, è opportuno segnalare soltanto che nel campione è stata rilevata una mutazione KRAS.

- Reazione di controllo del campione  $C_T < 21,92$ : il risultato sarà "Invalid" (Non valido). La concentrazione del DNA è troppo alta per l'analisi mutazionale. Diluire con acqua priva di nucleasi per diluizione (Dil.) e ripetere il test. Diluire fino a un valore  $C_T$  di 21,92-32,00. Una diluizione 1:1 aumenta il valore  $C_T$  di circa 1,0.
- Valore  $C_T$  della reazione di controllo del campione tra 21,92 e 32,00 ( $21,92 \leq C_T$  di controllo  $\leq 32,00$ ): il risultato è "Valid" (Valido), la concentrazione del DNA è idonea all'analisi mutazionale.

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

14. Per generare file di report, fare clic su Report. Viene visualizzata la finestra "Report Browser" (Browser dei report). Selezionare KRAS Analysis Report (Report analisi KRAS) in Templates (Modelli), quindi fare clic su Show (Mostra) (Figura 12).

**Nota:** è possibile salvare i report in un percorso alternativo, nel formato webarchive, facendo clic sul pulsante Save As (Salva con nome) nell'angolo in alto a sinistra di ogni report.



**Figura 12. Selezione di "KRAS Analysis Report" (Report analisi KRAS).** 1 = "Report"; 2 = finestra "Report Browser" (Browser dei report); 3 = "KRAS Analysis Report" (Report analisi KRAS); 4 = "Show" (Mostra).

## Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS

Questo protocollo consente di rilevare le mutazioni KRAS.

Punti importanti prima di iniziare

- Un campione può essere analizzato utilizzando gli esami per le mutazioni KRAS solo dopo che ha superato la fase di valutazione.
- Per un uso efficiente del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, è necessario raggruppare i campioni in batch di 7 (per riempire il rotore a 72 pozzetti). Utilizzando batch più piccoli si potranno analizzare meno campioni con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Il campione deve essere analizzato con tutte le miscele di reazione fornite nel *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Non agitare in vortex la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) o qualsiasi miscela contenente *Taq* DNA polimerasi, in quanto l'enzima potrebbe inattivarsi.
- Pipettare la *Taq* DNA polimerasi inserendo delicatamente il puntale della pipetta appena sotto la superficie del liquido, per evitare che il puntale si cosparga di enzima in eccesso.
- Per ridurre al minimo gli errori di controlli e campioni, è necessario osservare scrupolosamente le linee guida delle *Istruzioni per l'uso del theascreen KRAS RGQ PCR Kit* relative alla corretta miscelazione dei reagenti che deve essere garantita in ogni fase della miscelazione durante la configurazione dell'esame.
- Assicurarsi che sia installato il software *theascreen KRAS Assay Package* corretto, corrispondente alla versione del software Rotor-Gene Q, prima di utilizzare per la prima volta lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

### Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Prima di ogni uso, è necessario lasciare scongelare tutti i reagenti per almeno 1 ora a temperatura ambiente (15-25°C), quindi miscelare capovolgendo ogni provetta per 10 volte e centrifugare brevemente affinché il contenuto si depositi sul fondo della provetta.
- Prima di ogni uso, assicurarsi che la *Taq* DNA polimerasi (provetta *Taq*) abbia raggiunto la temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugare brevemente la provetta affinché l'enzima si depositi sul fondo. La corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

### Procedura

1. Lasciare scongelare completamente a temperatura ambiente (15-25°C) per almeno 1 ora tutte le miscele delle reazioni nelle provette, l'acqua priva di nucleasi per il controllo senza template e il controllo positivo (provetta PC) KRAS.

I tempi per lo scongelamento dei reagenti, l'allestimento della PCR e la conservazione prima dell'avvio della seduta sono indicati nella tabella seguente.

**Tabella 6. Tempo di scongelamento dei reagenti**

Tempo di scongelamento			
Minimo	Massimo	Temperatura di conservazione dopo allestimento PCR	Tempi massimi per allestimento PCR e conservazione
1 ora	4,5 ore	Temperatura ambiente (15-25°C)	7 ore
1 ora	4,5 ore	2-8°C	18 ore

**Nota:** l'allestimento della PCR deve avvenire a temperatura ambiente. Il termine "conservazione" si riferisce al tempo compreso tra il completamento dell'allestimento PCR e l'inizio della seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx.

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

- Quando i reagenti si saranno scongelati, miscelarli capovolgendo ogni provetta 10 volte per prevenire concentrazioni localizzate di sali, quindi centrifugare direttamente affinché il contenuto si depositi sul fondo.

**Nota:** la corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

- Etichettare 8 provette per microcentrifuga (non fornite) corrispondenti a ognuna delle miscele di reazione illustrate nella tabella che segue. Preparare le miscele master (miscela di controllo o della reazione di mutazione [Provetta CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL o 13ASP] più Taq DNA polimerasi [Taq]) in quantità sufficiente per i campioni di DNA, per una reazione di controllo positivo (Provetta PC) KRAS e per una reazione di controllo Provetta NTC con acqua priva di nucleasi, rispettando i volumi illustrati nella tabella. Includere i reagenti per 1 campione extra, in modo da fornire una quantità più che sufficiente per l'allestimento PCR.

**Nota:** le miscele master contengono tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il campione.

**Tabella 7. Miscela master mix e volume corrispondente**

Esame e provetta con miscela di reazione	Volume della miscela di reazione	Volume di Taq DNA polimerasi
Controllo (provetta CTRL)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ALA (provetta 12ALA)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ASP (provetta 12ASP)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12ARG (provetta 12ARG)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12CYS (provetta 12CYS)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12SER (provetta 12SER)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
12VAL (provetta 12VAL)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)
13ASP (provetta 13ASP)	19,76 $\mu\text{l}$ x (n + 1)	0,24 $\mu\text{l}$ x (n + 1)

\* n = numero di reazioni (campioni più controlli).

Preparare le miscele master in quantità sufficiente per 1 campione extra (n + 1) in modo da avere a disposizione un'eccedenza per l'allestimento PCR. Il valore n non deve superare 7 (più i controlli), in quanto 7 è il numero massimo di campioni che possono essere inclusi in una seduta.

**Nota:** durante la preparazione delle miscele master dell'esame, dapprima viene aggiunto nella provetta il volume richiesto di miscela di controllo o di reazione alla mutazione e, in ultimo, viene aggiunta la Taq DNA polimerasi (provetta Taq).

- Caricare il numero necessario di strisce di 4 provette per PCR (ogni striscia ha 4 provette) sul blocco di caricamento in base alla disposizione illustrata nella Tabella 4. Disposizione della seduta sul blocco di caricamento per la valutazione dei campioni di DNA. I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore. Nonappare le provette.

**Nota:** lasciare i tappi nel contenitore di plastica finché non servono.

- Impostare una pipetta su un volume inferiore rispetto al volume totale delle miscele di reazione, quindi miscelare con cura le miscele master aspirando completamente in su e in giù per 10 volte.

**Nota:** la corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.

Ai fini della rilevazione delle mutazioni KRAS, è necessario aggiungere le miscele master per l'esame in 8 provette PC, 8 provette NTC e 8 provette per ogni campione di DNA.

6. Aggiungere immediatamente 20 µl di miscela master in ogni provetta della striscia per PCR appropriata.

**Nota:** per conoscere la disposizione delle provette durante la preparazione delle miscele delle reazioni, vedere la Tabella 8. Ai fini della rilevazione delle mutazioni KRAS, è necessario aggiungere le miscele master in 8 provette PC, 8 provette NTC e 8 provette per ogni campione di DNA.

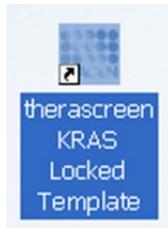
**Tabella 8. Disposizione della seduta sul blocco di caricamento per la rilevazione delle mutazioni KRAS**

Esame	Controlli		N° campione						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* I numeri identificano le posizioni nel blocco di caricamento e indicano la posizione finale sul rotore.

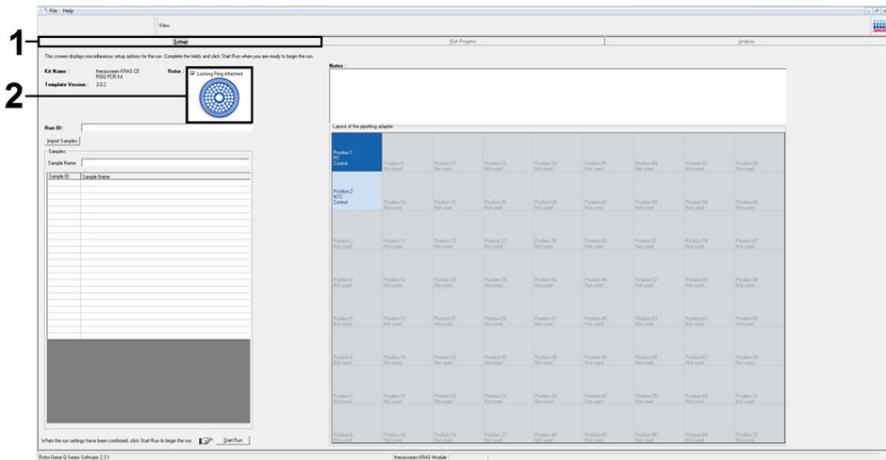
7. Aggiungere immediatamente 5 µl di acqua priva di nucleasi per controllo senza template (No Template Control, NTC) nelle provette NTC (posizioni provette 9-16) e chiudere con i tappi.
8. Aggiungere 5 µl di ogni campione di DNA nelle provette dei campioni (posizioni provette 17-72) e chiudere con i tappi.

9. Aggiungere 5 µl di controllo positivo (Positive Control, PC) KRAS nelle provette PC (posizioni provette 1-8) e chiudere con i tappi.
10. Con un pennarello indelebile contrassegnare i tappi delle prime provette nella posizione numerica più bassa di ogni striscia di 4 provette per PCR (vale a dire le posizioni 1, 5, 9 e così via) per mostrare l'orientamento con cui devono essere caricate le provette sul rotore a 72 pozzetti dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Capovolgere 4 volte le provette tappate per miscelare il campione e la miscela della reazione.  
**Nota:** la corretta miscelazione dei reagenti deve essere garantita durante la configurazione dell'esame.
12. Inserire tutte le strisce di 4 provette per PCR nelle posizioni corrette del rotore a 72 pozzetti, rispettando la disposizione della seduta (Tabella 8) e utilizzando i segni come orientamento.  
**Nota:** è possibile includere al massimo 7 campioni in ogni seduta PCR. Se il rotore non è completamente pieno, è necessario occupare tutte le posizioni libere del rotore con una provetta vuota tappata. In tal modo viene mantenuta l'efficienza termica dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Caricare il rotore a 72 pozzetti sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Assicurarsi che l'anello di bloccaggio (fornito con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) sia posizionato sopra al rotore, in modo da tenere ferme le provette durante il ciclo.
14. Fare doppio clic sull'icona theascreen KRAS Locked Template (Modello bloccato theascreen KRAS) sul desktop del portatile collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Figura 13) per avviare il software Rotor Gene Q MDx 5plex HRM.



**Figura 13.** L'icona "therascreen KRAS Locked Template" (Modello bloccato therascreen KRAS).

La scheda Setup (Configurazione) viene visualizzata per impostazione predefinita (Figura 14).



**Figura 14.** 1 = scheda "Setup" (Configurazione); 2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato).

15. Verificare che l'anello di bloccaggio sia posizionato correttamente e selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato). Chiudere il coperchio dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Immettere l'ID della seduta nel campo "Run ID" (ID seduta) in base alle convenzioni di denominazione locali.
17. Immettere il nome del campione nel campo "Sample Name" (Nome campione) in base alle convenzioni di denominazione locali, quindi premere il tasto "Return" (Invio).

---

Il nome del campione verrà aggiunto all'elenco dei campioni in basso e al campione verrà assegnato un "Sample ID" (ID campione) del tipo 1, 2, 3 e così via. Inoltre il riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) sul lato destro verrà aggiornato in modo da includere il nome del campione (Figura 15).

**Nota:** nel riquadro Layout of the pipetting adapter (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) verificare che il nome del campione appena aggiunto sia evidenziato da un cambio di colore e che i nomi di tutti e 8 gli esami nella colonna sotto il cerchio del campione siano evidenziati (Figura 15).

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

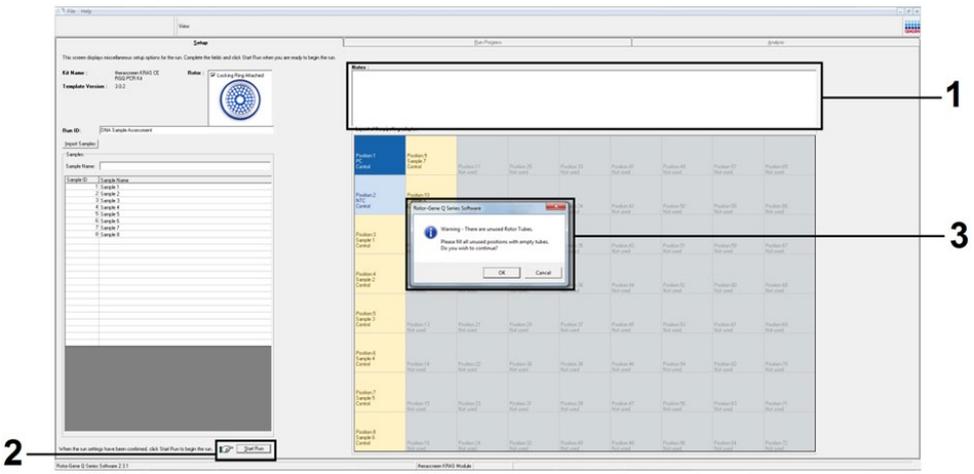
**Nota:** i campioni i cui nomi sono composti da più di 8 caratteri potrebbero non essere visualizzati per intero nel riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento).

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



18. Ripetere il passaggio 14 per immettere i nomi di tutti gli altri campioni (Figura 16).

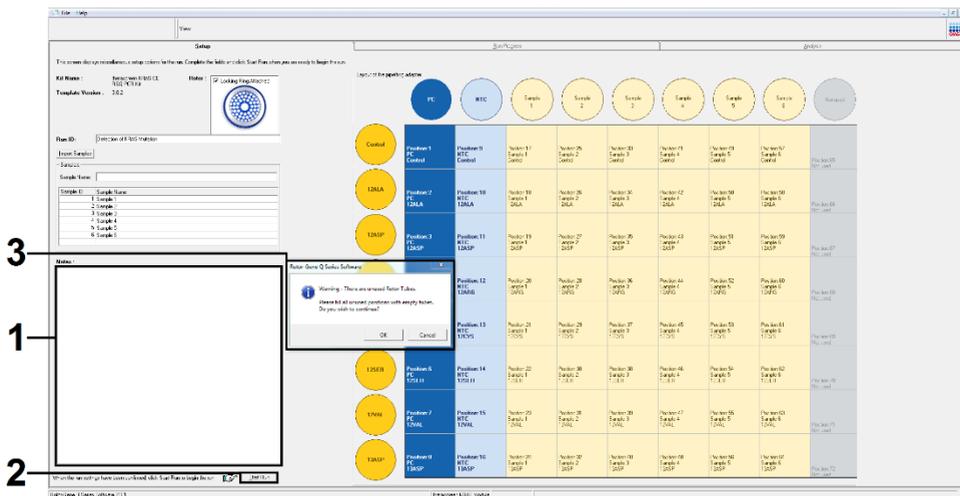
**Nota:** per modificare il nome di un campione, fare clic su "Sample Name" (Nome campione) nell'elenco dei campioni; il nome del campione selezionato verrà visualizzato nel campo "Sample Name" (Nome campione), appena sopra l'elenco. Modificare il nome del campione rispettando le convenzioni di denominazione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



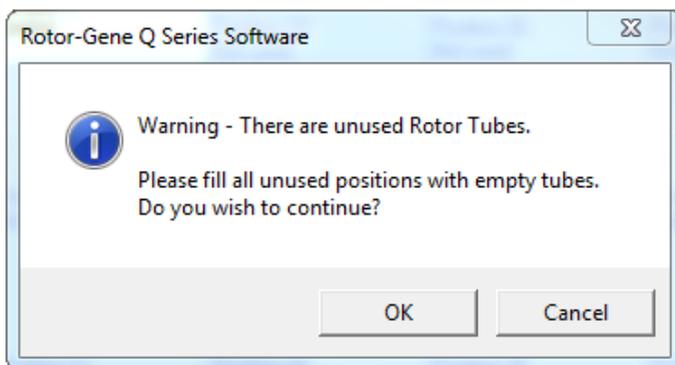
**Figura 16. Immissione di altri nomi di campioni nel campo "Sample Name" (Nome campione).** 1 = campo "Sample Name" (Nome campione); 2 = "Sample List" (Elenco campioni); 3 = riquadro "Layout of the pipetting adapter" (Configurazione dell'adattatore di pipettamento) con ulteriori nomi di campioni.

19. Dopo aver immesso i nomi di tutti i campioni, verificare che siano corretti. Se necessario, aggiungere ulteriori informazioni nel campo Notes (Annotazioni) e fare clic sul pulsante Start Run (Avvia seduta) (Figura 17).

**Nota:** se qualche posizione del rotore è inutilizzata, viene visualizzato un messaggio "Warning" (Avvertenza) (Figura 17 e Figura 18) per ricordare all'utente che è necessario occupare tutte le posizioni del rotore, eventualmente con una provetta vuota tappata. Assicurarsi che tutte le posizioni del rotore prima inutilizzate siano ora occupate con una provetta vuota tappata, quindi fare clic su OK per proseguire.



**Figura 17.** 1 = campo "Notes" (Annotazioni); 2 = "Start Run" (Avvia seduta); 3 = "Warning" (Avvertenza) relativa alle posizioni del rotore inutilizzate.



**Figura 18.** Messaggio "Warning" (Avvertenza) relativa alle posizioni del rotore inutilizzate.

20. Nella finestra Save As (Salva con nome), scegliere un nome file adeguato e salvare la seduta PCR con l'estensione \*.rex nel percorso selezionato (Figura 19).

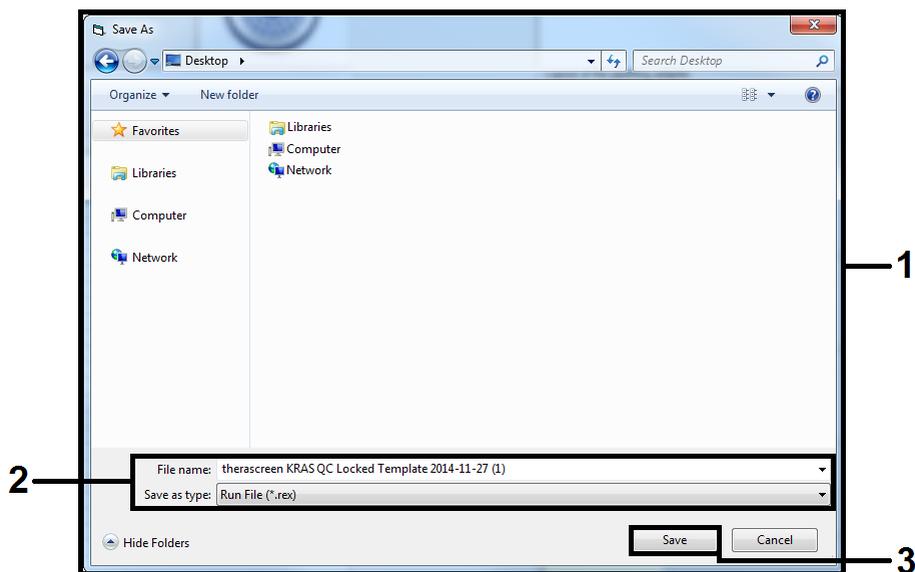
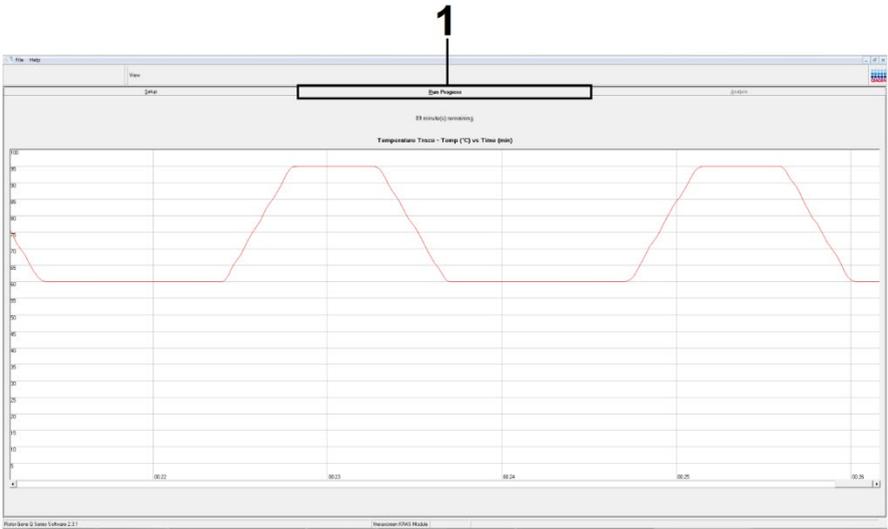


Figura 19. Salvataggio del file della seduta.

La seduta PCR viene avviata.

**Nota:** quando la seduta ha inizio, si apre automaticamente la scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta) per mostrare il tracciato della temperatura e il tempo rimanente per la seduta (Figura 20).



**Figura 20.** Scheda "Run Progress" (Avanzamento seduta).

Quando la seduta si conclude, si apre automaticamente la scheda "Analysis" (Analisi).

**Nota:** se ciò non avviene automaticamente, fare clic sulla scheda "Analysis" (Analisi) (Figura 21).

**Nota:** una spiegazione del metodo di calcolo viene fornita nella sezione "Interpretazione dei risultati".

The screenshot shows the 'Analysis' tab of a software interface. It contains three tables:

- Run Controls, Positive Control:** A table with columns: Rotor Position, Control, Assay, Flags/Warnings, and Positive Control Status. All 'Positive Control Status' values are 'Valid'.
- Run Controls, Negative Control:** A table with columns: Rotor Position, Assay, NTC, Internal Control, Flags/Warnings, and Negative Control Status. All 'Negative Control Status' values are 'Valid'.
- Sample Result Table:** A table with columns: Sample ID, Sample Name, KRAS Status, Flags/Warnings, and KRAS Mutation Status. The 'KRAS Mutation Status' column contains values like 'No Mutation Detected' and '13KSP Detected'.

Numbered callouts in the image indicate: 1 points to the 'Analysis' tab; 2 points to the 'Run Controls, Positive Control' table; 3 points to the 'Run Controls, Negative Control' table; 4 points to the 'Sample Result Table'; 5 points to the 'KRAS Mutation Status' column.

**Figura 21. La scheda "Analysis" (Analisi) e i risultati riportati.** 1 = scheda "Analysis" (Analisi); 2 = riquadro "Run Controls, Positive Control" (Controlli seduta, Controllo positivo); 3 = riquadro "Run Controls, Negative Control" (Controlli seduta, Controllo negativo); 4 = "Sample Result Table" (Tabella risultati campioni); 5 = colonna "KRAS Mutation Status" (Stato mutazione KRAS).

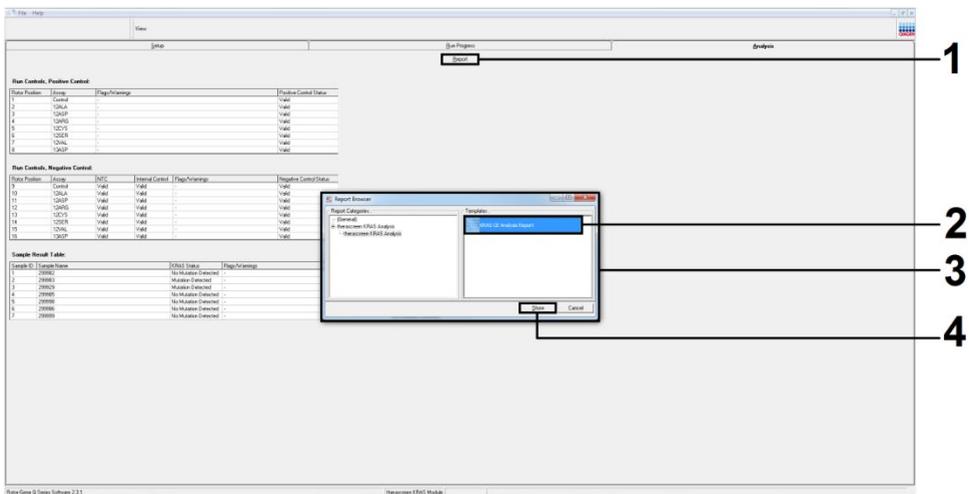
I risultati degli esami verranno riportati nel modo seguente (Figura 21).

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

- Riquadro "Run Controls, Negative Control" (Controlli seduta, Controllo negativo): Se entrambi i risultati "NTC" (Controllo senza template) e "Internal Control" (Controllo interno) rientrano nei limiti di accettabilità, nel campo "Negative Control Status" (Stato controllo negativo) comparirà "Valid" (Valido), in caso contrario comparirà "Invalid" (Non valido).
- Riquadro "Sample Result Table" (Tabella risultati campioni): le specifiche mutazioni rilevate nei campioni positivi verranno indicate nella colonna "KRAS Mutation Status" (Stato mutazione KRAS).

21. Per generare file di report, fare clic su Report. Viene visualizzata la finestra "Report Browser" (Browser dei report). Selezionare KRAS Analysis Report (Report analisi KRAS) in Templates (Modelli), quindi fare clic su Show (Mostra) (Figura 22).

**Nota:** è possibile salvare i report in un percorso alternativo, nel formato webarchive, facendo clic su Save As (Salva con nome) nell'angolo in alto a sinistra di ogni report.



**Figura 22. Selezione di "KRAS Analysis Report" (Report analisi KRAS).** 1 = "Report"; 2 = finestra "Report Browser" (Browser dei report); 3 = "KRAS Analysis Report" (Report analisi KRAS); 4 = "Show" (Mostra).

---

**Nota solo per campioni NSCLC:** Per evitare l'identificazione di un risultato di mutazione G12C (12CYS) falso, i campioni con gli errori elencati di seguito devono essere interpretati come Non validi.

- SAMPLE\_INT\_CTRL\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_POSITIVE\_AND\_INVALID
- SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL
- MUTATION\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_INVALID\_DATA

# Interpretazione dei risultati

L'analisi e le classificazioni delle mutazioni vengono eseguite automaticamente dal Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package al termine di una seduta. Le informazioni che seguono spiegano il modo in cui il Rotor Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package esegue l'analisi e classifica le mutazioni.

## Analisi e classificazioni delle mutazioni

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

Il software Rotor-Gene Q esegue l'interpolazione dei segnali di fluorescenza tra 2 valori qualsiasi registrati. Di conseguenza i valori  $C_T$  possono essere un qualsiasi numero reale (non limitato agli interi) compreso nell'intervallo tra 0 e 40.

Nel caso del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, il valore soglia è impostato su 0,05 unità di fluorescenza relativa. Questo valore è preimpostato nel *therascreen* KRAS Assay Package per entrambi i canali di fluorescenza Green e Yellow. Il valore soglia è stato determinato nel corso dello sviluppo del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Per determinare il valore  $\Delta C_T$ , viene eseguito un calcolo basato sull'equazione:

$$\Delta C_T = [\text{valore } C_T \text{ dell'esame di mutazione}] - [\text{valore } C_T \text{ dell'esame di controllo}]$$

I controlli della seduta (controllo positivo, NTC e controlli interni) vengono valutati per assicurare che siano rispettati i valori  $C_T$  accettabili e che le reazioni siano avvenute in modo corretto.

---

I valori  $\Delta C_T$  dei campioni vengono calcolati come differenza tra il valore  $C_T$  dell'esame di mutazione e il valore  $C_T$  dell'esame di controllo ottenuti dallo stesso campione. I campioni sono classificati come positivi alla mutazione se restituiscono un valore  $\Delta C_T$  minore o uguale al valore  $\Delta C_T$  di cut-off per l'esame. Al di sopra di questo valore, infatti, il campione potrebbe contenere una mutazione percentualmente inferiore al limite di sensibilità del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit oppure potrebbe essere negativo alla mutazione e quindi classificato come "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata).

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

I risultati degli esami possono essere visualizzati come "[mutation name] Detected" ([nome della mutazione] rilevata), "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata), "Invalid" (Non valido) o, se un controllo della seduta ha esito negativo, "Run Control Failed" (Controllo seduta fallito). Nel caso di campioni positivi alle mutazioni, verranno indicate le specifiche mutazioni.

Per l'interpretazione degli errori generati dal Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, vedere Avvisi generati dal software *therascreen* KRAS Assay Package.

**Nota:** Raramente un tumore contiene più di una mutazione. In questi casi verrà identificata la mutazione che genera il valore  $\Delta C_T$  più basso.

# Limitazioni

Il test è progettato per la rilevazione di 7 mutazioni nei codoni 12 e 13 del gene KRAS. I campioni i cui risultati sono classificati come "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata) potrebbero celare mutazioni KRAS che non vengono rilevate dall'esame (ad esempio, 13CYS).

La rilevazione delle mutazioni dipende dall'integrità del campione e dalla quantità di DNA amplificabile presente nel campione. È opportuno ripetere la procedura qualora la valutazione iniziale del DNA nel campione indichi una quantità insufficiente o eccessiva per l'analisi mutazionale.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è utilizzato in una procedura basata sulla reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Come accade con tutte le procedure PCR, i campioni potrebbero essere contaminati da fonti esterne di DNA presenti nel laboratorio o dal DNA contenuto nel controllo positivo. Prestare attenzione per evitare la contaminazione dei campioni e dei reagenti delle miscele delle reazioni.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit non deve essere utilizzato a scopi diagnostici.

Per i campioni CRC, il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è destinato esclusivamente alla discriminazione tra campioni wild-type e mutante. La formulazione del test assicura che ogni reazione mutante è più sensibile alla mutazione specifica che misura. Tuttavia, nei campioni in cui viene rilevata una mutazione è possibile osservare la reattività crociata con altre reazioni di mutazione. Se il campione è positivo a più di una reazione di mutazione, il risultato da considerare è quello con il valore  $\Delta C_T$  più basso.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è approvato esclusivamente per l'uso con tessuto di carcinoma coloretta e di carcinoma polmonare non a piccole cellule fissato in formalina e incluso in paraffina.

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è approvato esclusivamente per l'uso con QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Soltanto lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM è stato approvato per l'uso con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

# Caratteristiche delle prestazioni

## Prestazioni analitiche

Le caratteristiche delle prestazioni specifiche del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sono state determinate attraverso studi basati sull'uso di campioni FFPE prelevati da pazienti CRC e NSCLC. I metodi di acquisizione impiegati per i campioni NSCLC includono l'agobiopsia con ago a scatto (Core Needle Biopsy, CNB), l'agoaspirato con ago sottile (Fine Needle Aspirate, FNA) e la resezione. Per ogni tipo di campione sono state utilizzate 8 linee cellulari umane FFPE, di cui 7 con mutazioni KRAS rilevate dall'esame e una con KRAS wild-type (vale a dire nessuna mutazione nei codoni 12 e 13). Lo stato mutazionale dei campioni è stato confermato tramite sequenziamento bidirezionale di Sanger.

## Cut-off

Per determinare i valori di cut-off dell'esame sono stati analizzati 225 campioni FFPE con un metodo conforme alle linee guida CLSI EP17-A (2004) (8). L'intervallo  $C_T$  della reazione di controllo è stato fissato tra 21,92 e 32,00. Nella Tabella 9 sono elencati i valori di cut-off che si ottengono sottraendo il valore  $C_T$  della reazione di controllo dal valore  $C_T$  delle reazioni delle mutazioni ( $\Delta C_T$ ).

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

	Esame delle mutazioni						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Cut-off ( $\leq \Delta C_T$ )	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

---

## Limite del bianco

Per valutare le prestazioni del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit in assenza di un template positivo alla mutazione e per assicurare che un campione bianco non generi un segnale analitico che potrebbe indicare una mutazione a concentrazione bassa, sono stati valutati campioni privi di template. I risultati hanno dimostrato che non erano presenti valori  $C_T$  di controllo o di mutazione rilevabili in nessuna delle provette con le reazioni delle mutazioni o di controllo (i valori  $C_T$  del controllo interno erano tutti validi).

## Confronto con il metodo di riferimento analitico: CRC

Sono stati condotti due studi per dimostrare la concordanza dello stato mutazionale dei campioni CRC analizzati con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit rispetto al sequenziamento bidirezionale. In totale 137 di questi campioni FFPE hanno prodotto risultati validi sia con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, sia con il sequenziamento bidirezionale.

I risultati complessivi sono riportati nella Tabella 10. Nella Tabella 11 è illustrata l'analisi della concordanza tra il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit e il sequenziamento bidirezionale.

**Tabella 10. Confronto tra il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit e il sequenziamento bidirezionale di Sanger**

Classificazione mediante il <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Classificazione delle mutazioni mediante sequenziamento bidirezionale								Totale
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
Negativo	80	-	-	1	-	-	-	1	82
Positivo a 12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
Positivo a 12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Positivo a 12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-	20
Positivo a 12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-	3
Positivo a 12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Positivo a 12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-	16
Positivo a 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11	12
<b>Totale</b>	<b>83</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>137</b>

**Tabella 11. Analisi della concordanza**

Misura della concordanza	Frequenza (%)	Intervallo di confidenza al 95% (IC)
Concordanza percentuale complessiva	132/137 (96,35)	92,69-98,21
Concordanza percentuale positiva	52/54 (96,30)	89,41-98,77
Concordanza percentuale negativa	80/83 (96,39)	91,30-98,55

È stata condotta una valutazione di un secondo gruppo univoco di campioni per integrare i dati ottenuti dal primo studio. È stato acquisito un gruppo di 271 campioni FFPE di CRC; 250 campioni con stato mutazionale sconosciuto e 21 con stato mutazionale noto (per aumentare i dati per le mutazioni rare) sono stati messi a confronto con il sequenziamento bidirezionale di Sanger nel modo descritto nei paragrafi precedenti.

L'analisi della concordanza ha interessato 247 campioni con risultati validi sia per il sequenziamento bidirezionale sia per il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. I campioni discordanti sono stati 9. Complessivamente, la concordanza è stata del 96,4%. I dati confermano l'accuratezza delle prestazioni del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (Tabella 13 e Tabella 14).

**Tabella 12. Confronto tra il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit e il sequenziamento bidirezionale di Sanger (secondo studio)**

		Classificazione delle mutazioni mediante sequenziamento bidirezionale									
		Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totale
Classificazione mediante il <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativo	261	-	-	-	-	-	-	-	1	262
	Positivo a 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
	Positivo a 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
	Positivo a 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
	Positivo a 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
	Positivo a 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Positivo a 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
	Positivo a 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
	Totale	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

**Tabella 13. Analisi della concordanza (secondo studio)**

Misura della concordanza	Frequenza (%)	Intervallo di confidenza al 95% (IC)
Concordanza percentuale complessiva	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Concordanza percentuale positiva	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Concordanza percentuale negativa	261/280 (93,21)	90,20-95,51

---

## Confronto con il metodo di riferimento analitico: NSCLC

Per dimostrare la concordanza dello stato mutazionale complessivo dei campioni di NSCLC analizzati con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit rispetto al sequenziamento bidirezionale di Sanger, i campioni FFPE di NSCLC sono stati acquisiti tramite resezione chirurgica, agoaspirato con ago sottile (Fine Needle Aspiration, FNA) e agobiopsia con ago a scatto (Core Needle Biopsy, CNB) durante questo studio. Da ogni campione è stato estratto il DNA prima di iniziare i test con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. I risultati di questo test sono quindi stati confrontati con quelli ottenuti tramite il sequenziamento bidirezionale di Sanger.

In totale 360 campioni hanno prodotto risultati validi sia con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, sia con il sequenziamento bidirezionale, e 340 campioni hanno generato risultati concordanti.

Nella Tabella 14 è illustrata la concordanza tra i risultati del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit e i risultati del sequenziamento bidirezionale. In due campioni è stata rilevata una doppia mutazione con il sequenziamento bidirezionale di Sanger. Poiché una mutazione corrispondeva al risultato ottenuto con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, questi campioni sono stati considerati concordanti ai fini dell'analisi della concordanza complessiva, della concordanza positiva e della concordanza negativa (Tabella 15).

**Tabella 14. Confronto tra il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit e il sequenziamento bidirezionale di Sanger**

		Classificazione delle mutazioni mediante sequenziamento bidirezionale									
Classificazione mediante il <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit		Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_12VAL	12VAL	13ASP	Totale
	Negativo	261	-	-	-	-	-	-	-	1	262
	Positivo α 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
	Positivo α 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
	Positivo α 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
	Positivo α 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
	Positivo α 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Positivo α 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
	Positivo α 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
	<b>Totale</b>	<b>280</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>35</b>	<b>1</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>360</b>

**Tabella 15. Analisi della concordanza**

Misura della concordanza	Frequenza (%)	Intervallo di confidenza al 95% (IC)
Concordanza percentuale complessiva	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Concordanza percentuale positiva	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Concordanza percentuale negativa	261/280 (93,21)	90,20-95,51

## Limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD)

L'intervallo di lavoro per il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è basato sulla quantità di DNA amplificabile nel campione, determinata dal valore  $C_T$  della reazione di controllo. L'intervallo iniziale dichiarato per l'esame è definito dall'intervallo preimpostato dei valori  $C_T$  di controllo, ovvero 21,92-32,00. Il limite di sensibilità è la percentuale minima di DNA mutante che può essere rilevata in un fondo di DNA wild-type quando il DNA amplificabile totale rientra nell'intervallo iniziale dichiarato ed è comunque inferiore al valore  $\Delta C_T$  di cut-off soglia.

## CRC

È stato svolto uno studio per determinare il limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) di ognuna delle 7 reazioni delle mutazioni specifiche incluse nel *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Per il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, il limite di sensibilità del DNA mutante in un fondo di DNA wild-type è definito come il fattore di diluizione più basso al quale è stato confermato positivo il 95% delle repliche dei test per ogni campione positivo alla mutazione.

A ogni esame sono stati applicati individualmente i modelli di regressione logistica per i set di dati con livelli di DNA iniziale bassi e alti. In questi modelli la variabile risposta era l'output binario di mutazione rilevata (rilevata = 1) e di mutazione non rilevata (rilevata = 0), la variabile esplicativa continua era  $\log_2$  della diluizione della % di mutazione. I limiti di sensibilità (Limit of Detection, LoD) sono stati calcolati come la diluizione della mutazione percentuale che ha prodotto una probabilità predetta di rilevazione pari a 0,95 (Tabella 16).

**Tabella 16. Valori LoD per ogni esame di mutazione utilizzando linee cellulari FFPE**

<b>Esame</b>	<b>Valore LoD C<sub>95</sub> (percentuale di DNA mutante in DNA wild-type)</b>
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

## NSCLC

Il limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) per gli esami del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è stato determinato e verificato utilizzando tessuto di carcinoma coloretale (CRC). Questi risultati LoD sono stati verificati nuovamente per il tessuto di carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Lo studio si è svolto in 2 parti. Nella prima parte, 60 repliche di 7 linee cellulari FFPE mutanti di tessuto NSCLC che rappresentavano le singole mutazioni sono state diluite fino al limite di sensibilità del rispettivo esame e sottoposte al test. In tutte e 60 le repliche delle linee cellulari FFPE per ogni campione valutato è stata rilevata una sensibilità del 100% per la rispettiva reazione di mutazione, al valore LoD valutato.

Nella seconda parte, 96 repliche di campioni clinici FFPE di NSCLC, che rappresentavano le singole mutazioni con 3 diversi metodi di acquisizione (resezione, agobiopsia con ago a scatto [Core Needle Biopsy, CNB] e agoaspirato con ago sottile [Fine Needle Aspiration, FNA]), sono state sottoposte al test dopo la diluizione fino al limite di sensibilità del rispettivo esame.

---

Le 96 repliche valide per le mutazioni 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL e 13ASP sono state classificate correttamente al 100%. Gli esami per 12CYS e 12SER hanno rilevato le mutazioni al 95,8%, al valore LoD.

Questo dimostra che il valore LoD definito in precedenza viene verificato per tutti gli esami di mutazione durante la valutazione dei campioni clinici FFPE di NSCLC/linee cellulari FFPE/campioni dello stesso paziente.

## DNA iniziale e linearità

### Impatto del livello di DNA iniziale sui valori $\Delta C_T$

Quando campioni con livelli di DNA totale diversi contengono la stessa percentuale di DNA mutante, si presume che i valori  $\Delta C_T$  misurati restino coerenti. L'obiettivo dello studio era dimostrare che le prestazioni del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sono coerenti per tutto l'intervallo di DNA totale iniziale (CT controllo) dell'esame. Per preparare pool di DNA con il valore  $C_T$  della reazione di controllo più basso che sia possibile ottenere, è stato utilizzato il DNA estratto da 8 linee cellulari FFPE. Gli stock di DNA concentrato sono stati successivamente diluiti per generare DNA a copertura dell'intero intervallo di lavoro (in totale 5 diluizioni, incluso lo stock concentrato iniziale).

Per ogni punto compreso nell'intervallo di lavoro è stato preparato materiale sufficiente per eseguire 6 repliche dei test. Nella Tabella 17 e nella Tabella 18 sono riportati l'intervallo di diluizione per ogni reazione di mutazione e il valore  $\Delta C_T$  medio ottenuto dai risultati. I valori  $\Delta C_T$  complessivi sono coerenti per l'intero intervallo di valori validi del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per tutti gli esami. Questo dimostra che il livello di DNA iniziale non influenza l'accuratezza della classificazione della mutazione nel campione.

**Tabella 17. Impatto del DNA iniziale sui valori  $\Delta C_T$  per tutto l'intervallo di valori  $C_T$  iniziali della reazione di controllo (linee cellulari CRC FFPE)**

Esame	$\Delta C_T$				
	Diluizione 1 ~20–21 $C_T$	Diluizione 2 ~23–24 $C_T$	Diluizione 3 ~26–27 $C_T$	Diluizione 4 ~29–30 $C_T$	Diluizione 5 ~32–33 $C_T$
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

\* Per la mutazione 12ASP il numero totale di repliche è stato 27.

**Tabella 18. Impatto del DNA iniziale sui valori  $\Delta C_T$  per tutto l'intervallo di valori  $C_T$  (campioni FFPE di NSCLC)**

Esame	$\Delta C_T$				
	Diluizione 1 ~20–21 $C_T$	Diluizione 2 ~23–24 $C_T$	Diluizione 3 ~26–27 $C_T$	Diluizione 4 ~29–30 $C_T$	Diluizione 5 ~32–33 $C_T$
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

\* A causa della bassa concentrazione di DNA, non è stato generato alcun valore  $C_T$  della reazione di mutazione e non è quindi stato calcolato nessun valore  $\Delta C_T$ .

## Efficienza della linearità/amplificazione in funzione del DNA iniziale

È stata dimostrata l'efficienza della linearità e dell'amplificazione della PCR per ogni reazione di mutazione, relativamente alla reazione di controllo, sull'intero intervallo di lavoro del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. L'efficienza dell'amplificazione è stata calcolata per ognuna delle reazioni di mutazione e per la reazione di controllo come  $[10(-1/\text{slope})] - 1$ .

L'efficienza dell'amplificazione del controllo rispetto alla reazione della mutazione indica che i valori  $\Delta C_T$ , e quindi la classificazione della mutazione, sono coerenti su tutto l'intervallo di lavoro dell'esame. Un riepilogo dei dati è mostrato nella Tabella 19 (campioni CRC) e nella Tabella 20 (campioni NSCLC).

**Tabella 19. Efficienza di amplificazione nelle reazioni di controllo e di mutazione: linee cellulari CRC**

Campione		Intercetta	Errore	Pendenza	Errore	Limite inferiore di confidenza al 95% bilaterale (pendenza)	Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale (pendenza)	Efficienza amplificazione	Differenza nelle efficienze di amplificazione
			standard intercetta	calcolata	standard (pendenza)				
12ALA	C <sub>T</sub>	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	controllo C <sub>T</sub> 12ALA	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	C <sub>T</sub>	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	controllo C <sub>T</sub> 12ARG	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	C <sub>T</sub>	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	controllo C <sub>T</sub> 12ASP	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	C <sub>T</sub>	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	controllo C <sub>T</sub> 12CYS	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	C <sub>T</sub>	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	controllo C <sub>T</sub> 12SER	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	C <sub>T</sub>	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	controllo C <sub>T</sub> 12VAL	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	C <sub>T</sub>	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	controllo C <sub>T</sub> 12ASP	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tabella 20. Efficienza di amplificazione nelle reazioni di controllo e di mutazione: campioni NSCLC

Campione		Intercetta	Errore standard intercetta	Pendenza calcolata	Errore standard (pendenza)	Limite inferiore di confidenza al 95% bilaterale (pendenza)	Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale (pendenza)	Efficienza amplificazione	Differenza nelle efficienze di amplificazione
12ALA	C <sub>T</sub>								
	controllo	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	<b>0,94</b>	0,069
	C <sub>T</sub>	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	<b>1,01</b>	
12ARG	C <sub>T</sub>								
	controllo	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
	C <sub>T</sub>	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	C <sub>T</sub>								
	controllo	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
	C <sub>T</sub>	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	C <sub>T</sub>								
	controllo	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
	C <sub>T</sub>	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	C <sub>T</sub>								
	controllo	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
	C <sub>T</sub>	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	C <sub>T</sub>								
	controllo	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
	C <sub>T</sub>	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	C <sub>T</sub>								
	controllo	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	C <sub>T</sub>	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

### Efficienza della linearità/amplificazione in funzione della mutazione percentuale

L'obiettivo di questo studio era valutare l'effetto che un campione positivo a una mutazione, diluito in serie, poteva avere sull'efficienza dell'amplificazione, per l'intero intervallo di lavoro del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, a partire da livelli iniziali di C<sub>T</sub> di circa 22-23 C<sub>T</sub>.

---

I DNA estratti dai campioni delle linee cellulari FFPE di CRC e di NSCLC sono stati sottoposti inizialmente a letture della densità ottica (Optical Density, OD), prima della PCR con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Gli stock di DNA sono stati quindi preparati fino a raggiungere un valore  $C_T$  della reazione di controllo pari a circa 23  $C_T$ . Gli stock sono stati sottoposti a diluizione seriale doppia, ogni volta utilizzando DNA wild-type, allo scopo di mantenere costante il DNA wild-type totale e, contemporaneamente, variare la percentuale di DNA mutante nel template.

Sono stati preparati pool di DNA sufficienti ad analizzare 6 repliche per ogni mutazione. Sono stati calcolati i dati  $C_T$  e  $\Delta C_T$  per ogni mutazione per ogni punto di diluizione. È stato messo a punto un modello di regressione lineare che mette a confronto il valore  $C_T$  della reazione di mutazione rispetto alla diluizione  $\log_2$  del DNA iniziale. Lo studio ha evidenziato che, in un fondo caratterizzato da una concentrazione costante di DNA wild-type, la diluizione delle mutazioni ha prodotto efficienze di amplificazione prive di variazioni significative al di fuori dei valori determinati nello studio di linearità sopra descritto.

## Sostanze interferenti

L'obiettivo di questo studio era valutare l'impatto di potenziali sostanze interferenti sulle prestazioni del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Tale operazione è stata eseguita analizzando l'impatto di ciascuna sostanza sui valori  $\Delta C_T$  e sullo stato di mutazione dei campioni di analisi tramite esperimenti di arricchimento a varie concentrazioni. Le sostanze potenzialmente interferenti provenienti dal processo di estrazione del DNA analizzate sono state: Buffer AL, Buffer ATL, etanolo, cera di paraffina, proteinasi K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 e xilene. Anche il tampone di eluizione finale del kit (Buffer ATE) è stato analizzato come controllo bianco.

Alle concentrazioni attese in circostanze normali, nessuna delle potenziali sostanze interferenti prese in esame ha compromesso la capacità del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit di distinguere tra campioni positivi e campioni negativi alla mutazione.

---

Oltre allo studio sulle sostanze interferenti, è stato valutato il potenziale effetto delle necrosi nei campioni clinici in modo da stabilire se livelli elevati di tessuto necrotico nei campioni di tumore possano compromettere la capacità di generare dati validi. Su un totale di 421 campioni valutati nell'ambito degli studi di confronto con il metodo di riferimento analitico, 29 campioni presentavano delle necrosi a un livello >50%, come stabilito dall'esame patologico. Di questi 29 campioni, 28 hanno generato risultati validi e concordanti con il sequenziamento bidirezionale di Sanger. Un solo risultato non era valido perché il DNA era insufficiente.

## Contaminazione crociata

L'obiettivo di questo studio era determinare l'entità della contaminazione crociata tra i campioni di DNA, utilizzando il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, che potrebbe generare potenziali risultati falsi positivi. Potenziali fonti di contaminazione crociata includono:

- Estrazione del campione (ad esempio, grattando i vetrini)
- Pipettamento dei campioni
- Chiusura (con i tappi) delle provette per campioni
- Contaminazione dei reagenti del kit durante l'uso
- Caricamento delle provette di analisi sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Per questo studio sono stati utilizzati gli standard FFPE: lo standard wild-type e lo standard 12ALA (dal momento che la reazione 12ALA è quella con il limite di sensibilità più basso del kit).

Lo studio prevedeva 10 sedute PCR per ricercare le potenziali contaminazioni sia nell'ambito di una stessa seduta che tra sedute diverse sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Durante le sedute analitiche sono state utilizzate provette contenenti DNA wild-type per verificare eventuali contaminazioni da DNA mutante.

I risultati dello studio hanno dimostrato l'assenza di contaminazione apprezzabile negli estratti di DNA wild-type utilizzati per rilevare la contaminazione crociata.

## Esclusività/reattività crociata

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è costituito da 8 reazioni distinte; un'unica reazione di controllo che rileva una regione non polimorfica del gene KRAS e 7 reazioni specifiche delle mutazioni. Non esiste una reazione che misura in modo specifico la sequenza KRAS wild-type nei codoni 12 o 13. Il risultato KRAS "No Mutation Detected" (Nessuna mutazione rilevata), vale a dire wild-type, si basa sull'assenza di tutte le 7 mutazioni che generano un risultato positivo.

Per assicurare che non verranno generati risultati falsi positivi, è pertanto necessario dimostrare la quantità di amplificazione non specifica, o di reattività crociata, che è possibile osservare in ogni reazione quando sono presenti quantità eccessive di DNA wild-type KRAS. Analogamente, viene valutata l'amplificazione non specifica per le mutazioni KRAS che non dovrebbero essere rilevate dall'esame. Questo dimostra che la quantità di reattività crociata tra le reazioni delle mutazioni non produce errori nella classificazione delle mutazioni in presenza di quantità eccessive di DNA mutante. Dal momento che il DNA iniziale per questo esame fa riferimento all'intervallo  $C_T$  di controllo (21,92-32,00), la concentrazione più elevata di DNA iniziale si basa su un valore  $C_T$  di controllo approssimativo di 22.

### Amplificazione non specifica/reattività crociata: DNA wild-type KRAS

È stata presa in considerazione la quantità di amplificazione non specifica di DNA wild-type da parte delle miscele di reazione che dovrebbero amplificare solo mutazioni specifiche. In totale, 60 repliche di DNA di linee cellulari FFPE wild-type e 60 campioni di NSCLC sono stati valutati alla concentrazione più alta di DNA iniziale amplificabile utilizzando il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

I valori  $C_T$  di controllo erano circa 22-23. I risultati dimostrano che i valori  $\Delta C_T$  hanno superato i limiti di cut-off impostati e che almeno il 95% delle repliche wild-type sono state classificate correttamente.

## Amplificazione non specifica/reattività crociata/esclusività: DNA KRAS positivo alla mutazione

I campioni mutanti che hanno un'alta concentrazione di DNA iniziale sono stati analizzati rispetto a tutte le miscele delle reazioni. Sono stati preparati campioni di DNA da ognuna delle linee cellulari FFPE di CRC e di NSCLC, in modo tale che il valore  $C_T$  della reazione di controllo corrispondesse a circa 23. Da queste diluizioni sono state ottenute 6 repliche da valutare per ogni campione di mutazione. La percentuale della mutazione nel campione dipendeva dalla percentuale del mutante nel DNA della linea cellulare.

Nella Tabella 21T20 e nella Tabella 22 sono riportati i valori  $\Delta C_T$  medi, che dimostrano la presenza di reattività- crociata tra le reazioni delle mutazioni. In tutti i casi, i risultati dimostrano che è stata classificata correttamente la mutazione con la reazione di mutazione corrispondente (in altre parole, il valore  $\Delta C_T$  più basso era la classificazione corretta della mutazione). Tutti gli altri casi dei test non sono stati rilevati o erano al di fuori del valore  $\Delta C_T$  soglia.

**Tabella 21. Reattività crociata ( $\Delta C_T$ ) tra le reazioni delle mutazioni utilizzando DNA da linea cellulare CRC FFPE all'intervallo iniziale alto**

DNA mutante	Cut-off	$\Delta C_T$ esame						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	<b>1,42*</b>	12,66	NA	<b>5,81†</b>	<b>2,78†</b>	<b>6,31†</b>	13,21
12ASP	6,6	12,56	<b>2,42*</b>	NA	NA	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	<b>1,12*</b>	11,42	NA	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	<b>0,98*</b>	NA	<b>7,96†</b>	12,88
12SER	8	NA	13,39	13,31	NA	<b>3,02*</b>	12,99	13,97
12VAL	7,5	<b>6,83†</b>	NA	NA	NA	13,38	<b>0,28*</b>	13,74
13ASP	7,5	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	<b>4,5*</b>

NA: nessuna reattività crociata.

\* Valori  $\Delta C_T$  dalle reazioni corrispondenti.

† Valori  $\Delta C_T$  ottenuti dalle reazioni con reattività crociata al di sotto del valore di cut-off.

**Tabella 22. Reattività crociata ( $\Delta C_T$ ) tra le reazioni delle mutazioni utilizzando DNA da linea cellulare NSCLC FFPE all'intervallo iniziale alto**

DNA mutante	Cut-off	$\Delta C_T$ esame						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	<b>1,31*</b>	12,8	NA	<b>5,01†</b>	<b>2,26†</b>	<b>5,57†</b>	12,65
12ASP	6,6	12,61	<b>1,66*</b>	NA	NA	NA	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	<b>0,81*</b>	11,24	NA	12,66	12,62
12CYS	8	NA	12,22	<b>7,84†</b>	<b>0,56*</b>	NA	13,06	11,84
12SER	8	NA	12,87	13,21	NA	<b>1,93*</b>	13,25	12,93
12VAL	7,5	<b>5,93†</b>	14,29	NA	NA	13,14	<b>0,45*</b>	12,39
13ASP	7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>2,02*</b>

NA: nessuna reattività crociata.

\* Valori  $\Delta C_T$  dalle reazioni corrispondenti.

† Valori  $\Delta C_T$  ottenuti dalle reazioni con reattività crociata al di sotto del valore di cut-off.

## Ripetibilità e riproducibilità

La precisione del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è stata determinata utilizzando un protocollo in cui erano integrati gli aspetti fondamentali delle procedure CLSI EP12-A ed EP5-A2 (21, 22). Per la valutazione sono stati utilizzati campioni di carcinoma colorettole (CRC). Un campione wild-type e un campione per ogni mutazione sono stati analizzati con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit da 2 operatori presso ciascuno dei 3 siti. Tutti i campioni e i controlli sono stati analizzati utilizzando 3 lotti di *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ogni giorno per 5 giorni, con 2 sedute al giorno e con 2 repliche di ogni campione in ogni seduta. I valori  $C_T$  e  $\Delta C_T$  ottenuti per ogni reazione in ogni campione sono stati inoltre analizzati applicando l'analisi delle componenti della varianza.

È stata dimostrata la riproducibilità del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per campioni wild-type e con mutante di basso livello (3xLoD), con classificazioni delle mutazioni corrette in almeno 39 casi su 40 per tutti gli esami dei diversi lotti, piattaforme e operatori, sia nello stesso laboratorio, sia tra laboratori diversi. Nelle Tabella 23 e Tabella 24 sono elencate le stime della varianza dimostrate (una volta per deviazione standard) utilizzando campioni 3xLoD e C50.

**Tabella 23. Stime della varianza dell'esame**

Esame	%CV per $\Delta C_T$		%CV per $C_T$ mutante		%CV per $C_T$ controllo		
	3xLoD	C50	3xLoD	C50	3xLoD	C50	WT
12ALA	13,14	8,32	1,87	2,02	0,97	1,12	1,12
12ARG	10,79	8,04	1,59	1,96	1,24	1,51	1,15
12ASP	12,86	5,87	1,11	1,00	0,90	0,90	1,04
12CYS	17,61	10,83	1,86	2,02	1,54	1,22	1,15
12SER	13,97	10,43	1,71	2,11	0,94	1,19	1,15
12VAL	9,66	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

**Tabella 24. Stime di precisione della ripetibilità**

Esame	%CV per $\Delta C_T$		%CV per $C_T$ mutante		%CV per $C_T$ controllo		
	3xLoD	C50	3xLoD	C50	3xLoD	C50	WT
12ALA	10,71	7,51	1,69	1,76	0,77	0,90	0,79
12ARG	9,83	8,04	1,21	1,76	0,84	1,33	0,90
12ASP	10,16	4,08	0,93	0,89	0,80	0,76	0,76
12CYS	13,15	8,80	1,31	1,76	1,40	1,01	0,76
12SER	6,76	6,18	1,10	1,48	0,80	0,90	0,90
12VAL	9,21	15,32	1,40	1,42	0,91	3,49	0,94
13ASP	8,67	7,01	1,30	1,65	0,91	1,19	0,97

È stata indicata la percentuale stimata sia complessiva, sia nell'ambito di ognuno dei siti, per quanto riguarda i campioni 3xLoD che hanno prodotto risultati di mutazione e wild-type. Per tutti gli esami e le combinazioni di campioni, almeno 79 repliche su 80 hanno fornito la classificazione corretta della mutazione. La percentuale complessiva di classificazioni corrette è stata del 99,6% (1115 su 1120); del 99,6% (558 su 560) per i campioni positivi a una mutazione (3xLoD) e del 99,5% (557 su 560) per i campioni nei quali non è stata rilevata una mutazione (wild-type) (Tabella 25).

**Tabella 25. Classificazioni corrette complessive**

Mutazione	Classificazioni corrette	
	Campioni 3xLoD	Campioni wild-type (basso)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

---

## NSCLC

È stata valutata la precisione del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit all'interno del laboratorio (ripetibilità). Sono state confermate sia la correttezza dei risultati delle mutazioni, sia la precisione dei valori  $\Delta C_T$  (la differenza nei valori  $C_T$  tra una Reazione di mutazione e la Reazione di controllo).

In totale, sono stati preparati 15 membri del pannello: uno per ciascuna delle 7 mutazioni rilevate dal kit KRAS (a LoD e 2xLoD) e un membro del pannello wild type (WT). I membri del pannello mutanti sono stati rappresentati da una linea cellulare FFPE o da un campione clinico, a seconda della disponibilità. Tutti i campioni sono stati normalizzati a un  $C_T$  di controllo di 27 e i campioni mutanti sono stati diluiti in DNA wild type per generare materiale sufficiente per i campioni a livelli di mutazione di 1x LoD e 2x LoD.

La percentuale di classificazioni corrette è riportata nella Tabella 26 per ciascun pannello di test e i valori di precisione per i risultati quantitativi sono riportati nella Tabella 27.

**Tabella 26. Percentuale delle classificazioni delle mutazioni corrette**

Raggruppamento delle variabili		Proporzione		Limite di confidenza al 95% bilaterale	
Livello del campione	Esame	Frazione	Percentuale	Inferiore	Superiore
2xLoD	12ALA	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12ARG*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12ASP	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12CYS	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12SER*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	12VAL	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
	13ASP*	28/28	100,00%	87,66%	100,00%
LoD	12ALA	39/40	97,50%	86,84%	99,94%
	12ARG	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12ASP	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12CYS	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12SER*	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	12VAL	40/40	100,00%	91,19%	100,00%
	13ASP*	38/40	95,00%	83,08%	99,39%
WT	Tutti	28/28	100,00%	87,66%	100,00%

\* Rappresentato dalla linea cellulare FFPE

**Tabella 27. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - ripetibilità**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra i giorni*	Tra le sedute n.*	Tra Rga*	Tra i litri del kit*	Tra operatori*	Residuo*	Totale
Delta C <sub>T</sub>	2xLoD	12ALA	28	5,54	(0,0000, 0,00%)	(0,1221, 2,20%)	(0,0443, 0,80%)	(0,0385, 0,70%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1335, 2,41%)	(0,1843, 3,33%)
		12ARG	28	4,80	(0,0000, 0,00%)	(0,1891, 3,94%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3244, 6,76%)	(0,3737, 7,79%)
		12ASP	28	4,72	(0,0860, 1,82%)	(0,1446, 3,06%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1463, 3,10%)	(0,1374, 2,91%)	(0,1751, 3,71%)	(0,2797, 5,93%)
		12CYS	28	5,66	(0,0563, 0,99%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0995, 1,76%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0390, 0,69%)	(0,2306, 4,08%)	(0,2498, 4,41%)
		12SER	28	5,36	(0,1429, 2,67%)	(0,0274, 0,51%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0647, 1,21%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1753, 3,27%)	(0,2129, 3,97%)
		12VAL	28	4,26	(0,0000, 0,00%)	(0,1016, 2,39%)	(0,0593, 1,39%)	(0,1128, 2,65%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2095, 4,92%)	(0,2457, 5,77%)
		13ASP	28	5,23	(0,0000, 0,00%)	(0,2892, 5,53%)	(0,0157, 0,30%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2171, 4,15%)	(0,3575, 6,83%)
	LoD	12ALA	40	6,36	(0,0000, 0,00%)	(0,1584, 2,49%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2346, 3,69%)	(0,2819, 4,43%)
		12ARG	40	5,45	(0,0036, 0,07%)	(0,1639, 3,01%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0797, 1,46%)	(0,1674, 3,07%)	(0,2397, 4,40%)
		12ASP	40	4,73	(0,0000, 0,00%)	(0,2485, 5,25%)	(0,1087, 2,30%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0816, 1,72%)	(0,1041, 2,20%)	(0,2837, 6,00%)
		12CYS	40	6,62	(0,1688, 2,55%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2056, 3,11%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2909, 4,40%)	(0,3652, 5,52%)
		12SER	40	6,37	(0,1006, 1,58%)	(0,3153, 4,95%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0340, 0,53%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2253, 3,54%)	(0,3854, 6,05%)
		12VAL	40	5,13	(0,2874, 5,60%)	(0,0976, 1,90%)	(0,0227, 0,44%)	(0,0874, 1,71%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1629, 3,18%)	(0,2965, 5,78%)
13ASP	38	6,26	(0,3433, 5,48%)	(0,1227, 1,96%)	(0,0778, 1,24%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3459, 5,52%)	(0,4738, 7,57%)		

\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 27. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - ripetibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra i giorni*	Tra le sedute n.*	Tra Rgt*	Tra i lotti del kit*	Tra operatori*	Residuo*	Totale
C <sub>T</sub> Green	2xLoD	12ALA	28	32,09	(0,0000, 0,00%)	(0,1314, 0,41%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0675, 0,21%)	(0,1073, 0,33%)	(0,1158, 0,36%)	(0,1957, 0,61%)
		12ARG	28	31,50	(0,0000, 0,00%)	(0,2598, 0,82%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3324, 1,06%)	(0,4189, 1,33%)
		12ASP	28	31,30	(0,0000, 0,00%)	(0,1891, 0,60%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0920, 0,29%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1800, 0,58%)	(0,2667, 0,85%)
		12CYS	28	32,07	(0,0000, 0,00%)	(0,2523, 0,79%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1606, 0,50%)	(0,2011, 0,63%)	(0,1512, 0,47%)	(0,3388, 1,06%)
		12SER	28	32,06	(0,0000, 0,00%)	(0,2049, 0,64%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1250, 0,39%)	(0,1177, 0,37%)	(0,1263, 0,39%)	(0,2648, 0,83%)
		12VAL	28	30,65	(0,0000, 0,00%)	(0,1772, 0,58%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1198, 0,39%)	(0,1063, 0,35%)	(0,1656, 0,54%)	(0,2639, 0,86%)
		13ASP	28	31,98	(0,0000, 0,00%)	(0,3773, 1,18%)	(0,0497, 0,16%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1813, 0,57%)	(0,4138, 1,29%)
LoD	LoD	12ALA	40	32,86	(0,0000, 0,00%)	(0,2332, 0,71%)	(0,0516, 0,16%)	(0,0840, 0,26%)	(0,1319, 0,40%)	(0,1780, 0,54%)	(0,3144, 0,96%)
		12ARG	40	31,90	(0,0000, 0,00%)	(0,2186, 0,69%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2289, 0,72%)	(0,1519, 0,48%)	(0,3106, 0,97%)
		12ASP	40	31,02	(0,0000, 0,00%)	(0,1762, 0,57%)	(0,1093, 0,35%)	(0,1296, 0,42%)	(0,2492, 0,80%)	(0,1005, 0,32%)	(0,2908, 0,94%)
		12CYS	40	33,14	(0,1216, 0,37%)	(0,0493, 0,15%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3468, 1,05%)	(0,0501, 0,15%)	(0,3155, 0,95%)	(0,4216, 1,27%)
		12SER	40	33,08	(0,0832, 25%)	(0,2591, 0,78%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2424, 0,73%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2258, 0,68%)	(0,3864, 1,17%)
		12VAL	40	31,62	(0,2858, 0,90%)	(0,0951, 0,30%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2244, 0,71%)	(0,0344, 0,11%)	(0,1763, 0,56%)	(0,3432, 1,09%)
		13ASP	38	33,09	(0,3237, 0,98%)	(0,1009, 0,31%)	(0,1409, 0,43%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2785, 0,84%)	(0,4133, 1,29%)

\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 27. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - ripetibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra i giorni*	Tra le sedute n.*	Tra Rgt*	Tra i lotti del kit*	Tra operatori*	Residuo*	Totale
C <sub>T</sub> Yellow	2xLoD	12ALA	28	33,20	(0,0000, 0,00%)	(0,0515, 0,16%)	(0,0330, 0,10%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0607, 0,18%)	(0,2117, 0,64%)	(0,2235, 0,67%)
		12ARG	28	33,05	(0,1397, 0,42%)	(0,1321, 0,40%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2393, 0,72%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3792, 1,15%)	(0,4559, 1,38%)
		12ASP	28	33,00	(0,0597, 0,18%)	(0,2131, 0,65%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1313, 0,40%)	(0,1954, 0,59%)	(0,3059, 0,93%)
		12CYS	28	33,19	(0,0646, 0,19%)	(0,0971, 0,29%)	(0,0233, 0,07%)	(0,0679, 0,20%)	(0,0863, 0,26%)	(0,1943, 0,59%)	(0,2378, 0,72%)
		12SER	28	32,85	(0,0525, 0,16%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0337, 0,10%)	(0,0937, 0,29%)	(0,1320, 0,40%)	(0,1588, 0,48%)
		12VAL	28	33,11	(0,0000, 0,00%)	(0,1026, 0,31%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1469, 0,44%)	(0,1469, 0,44%)	(0,2912, 0,88%)	(0,3458, 1,04%)
		13ASP	28	33,03	(0,0000, 0,00%)	(0,1928, 0,58%)	(0,1015, 0,31%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1450, 0,44%)	(0,2493, 0,75%)
LoD	LoD	12ALA	40	33,37	(0,0000, 0,00%)	(0,2010, 0,60%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1942, 0,58%)	(0,2177, 0,65%)	(0,3257, 0,98%)
		12ARG	40	33,14	(0,0000, 0,00%)	(0,2168, 0,65%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3061, 0,92%)	(0,1637, 0,49%)	(0,1748, 0,53%)	(0,3717, 1,12%)
		12ASP	40	32,98	(0,0000, 0,00%)	(0,2599, 0,79%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1735, 0,53%)	(0,2228, 0,68%)	(0,3618, 1,10%)
		12CYS	40	33,31	(0,0000, 0,00%)	(0,2028, 0,61%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1209, 0,36%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2132, 0,64%)	(0,3050, 0,92%)
		12SER	40	33,08	(0,1254, 0,38%)	(0,2847, 0,86%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1505, 0,46%)	(0,3263, 0,99%)
		12VAL	40	33,29	(0,3133, 0,94%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2621, 0,79%)	(0,3574, 1,07%)
		13ASP	40	33,13	(0,1101, 0,33%)	(0,1326, 0,40%)	(0,1666, 0,50%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1925, 0,58%)	(0,2804, 0,85%)

\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 27. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - ripetibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra i giorni*	Tra le sedute n.*	Tra Rgq*	Tra i lotti del kit*	Tra operatori*	Residuo*	Totale
C <sub>T</sub> Yellow	WT	12ALA	28	33,41	(0,1443, 0,43%)	(0,1997, 0,60%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2269, 0,68%)	(0,3248, 0,97%)
		12ARG	28	33,30	(0,0875, 0,26%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,4098, 1,23%)	(0,0904, 0,27%)	(0,2368, 0,71%)	(0,3983, 1,20%)
		12ASP	28	33,12	(0,1591, 0,48%)	(0,1748, 0,53%)	(0,0477, 0,14%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2131, 0,64%)	(0,3075, 0,93%)
		12CYS	28	33,42	(0,0000, 0,00%)	(0,2009, 0,60%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1444, 0,43%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2121, 0,63%)	(0,3077, 0,92%)
		12SER	28	33,22	(0,2485, 0,75%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0633, 0,19%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1497, 0,45%)	(0,2517, 0,76%)
		12VAL	28	33,35	(0,0000, 0,00%)	(0,2591, 0,78%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1429, 0,43%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2721, 0,82%)	(0,3863, 1,16%)
		13ASP	28	33,45	(0,0000, 0,00%)	(0,1194, 0,36%)	(0,0526, 0,16%)	(0,0341, 0,10%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1651, 0,49%)	(0,2078, 0,62%)

\* SD, %CV

È stata valutata la precisione del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tra laboratori (riproducibilità). Sono stati utilizzati tre diversi laboratori (siti di test). Per questo studio è stato utilizzato lo stesso pannello di test utilizzato per lo studio di ripetibilità. Le condizioni del laboratorio erano diverse in ogni sito in base allo strumento RGQ, all'operatore, al lotto del kit KRAS e alle sedute al giorno per ottenere un totale di 88 sedute per sito in 22 giorni non consecutivi.

La percentuale complessiva di classificazioni delle mutazioni corrette è riportata nella Tabella 28. I valori di precisione per i risultati quantitativi sono riportati nella Tabella 29. La riproducibilità totale del kit KRAS è mostrata nella colonna #Totale (SD, CV%) della Tabella 29.

**Tabella 28. Percentuale delle classificazioni delle mutazioni corrette in tutti i siti**

Raggruppamento delle variabili		Proporzione		Limite di confidenza al 95% bilaterale	
Livello del campione	Esame	Frazione	Percentuale	Inferiore	Superiore
2xLoD	12ALA	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12ARG*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12ASP	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12CYS	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12SER*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	12VAL	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
	13ASP*	84/84	100,00%	95,70%	100,00%
LoD	12ALA	118/120	98,33%	94,11%	99,80%
	12ARG	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12ASP	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12CYS	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	12SER*	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	12VAL	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	13ASP*	118/120	98,33%	94,11%	99,80%
WT	Tutti	82/84	97,62%	91,66%	99,71%

\* Rappresentato dalla linea cellulare FFPE

**Tabella 29. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - riproducibilità**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra siti*	Tra i giorni all'interno del sito*	Tra le sedute n. All'interno del sito*	Tra Rgg all'interno del sito*	Tra i lotti del kit all'interno del sito*	Tra operatori all'interno del sito*	Residuo*	Totale
Delta C <sub>t</sub>	2xLoD	12ALA	84	5,48	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1669, 3,05%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1287, 2,35%)	(0,1679, 3,07%)	(0,2640, 4,82%)
		12ARG	84	4,81	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1172, 2,43%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2729, 5,67%)	(0,2967, 6,16%)
		12ASP	84	4,57	(0,0000, 0,00%)	(0,0943, 2,06%)	(0,1457, 3,19%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0600, 1,31%)	(0,1718, 3,76%)	(0,1565, 3,43%)	(0,2854, 6,25%)
		12CYS	84	5,61	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2060, 3,67%)	(0,0264, 0,47%)	(0,0698, 1,24%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1671, 2,98%)	(0,2728, 4,87%)
		12SER	84	5,34	(0,0000, 0,00%)	(0,1362, 2,55%)	(0,1669, 3,13%)	(0,1527, 2,86%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2020, 3,79%)	(0,2382, 4,46%)	(0,3902, 7,31%)
		12VAL	84	4,13	(0,0874, 2,11%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1677, 4,06%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0869, 2,10%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2711, 6,56%)	(0,3359, 8,12%)
		13ASP	84	5,22	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2161, 4,14%)	(0,2712, 5,20%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1930, 3,70%)	(0,2275, 4,36%)	(0,4279, 8,20%)
	LoD	12ALA	119	6,33	(0,0000, 0,00%)	(0,0410, 0,65%)	(0,1207, 1,91%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0247, 0,39%)	(0,2640, 4,17%)	(0,2936, 4,64%)
		12ARG	120	5,42	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1797, 3,31%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1872, 3,45%)	(0,2590, 4,78%)
		12ASP	120	4,66	(0,1183, 2,54%)	(0,0646, 1,38%)	(0,2121, 4,55%)	(0,0261, 0,56%)	(0,0217, 0,46%)	(0,0440, 0,94%)	(0,1455, 3,12%)	(0,2862, 6,14%)
		12CYS	120	6,54	(0,0000, 0,00%)	(0,0132, 0,20%)	(0,1775, 2,72%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1621, 2,48%)	(0,1708, 2,61%)	(0,4202, 6,43%)	(0,4981, 7,62%)
		12SER	120	6,28	(0,0000, 0,00%)	(0,0824, 1,31%)	(0,2271, 3,62%)	(0,0775, 1,24%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2383, 3,80%)	(0,3164, 5,04%)	(0,4570, 7,28%)
		12VAL	120	5,05	(0,0315, 0,62%)	(0,1648, 3,26%)	(0,0955, 1,89%)	(0,0703, 1,39%)	(0,0320, 0,63%)	(0,0795, 1,57%)	(0,2120, 4,20%)	(0,2965, 5,87%)
13ASP	118	6,17	(0,0000, 0,00%)	(0,1673, 2,71%)	(0,1987, 3,22%)	(0,2332, 3,78%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0843, 1,37%)	(0,3075, 4,99%)	(0,4488, 7,28%)		

\*\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 29. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - riproducibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra siti*	Tra i giorni all'interno del sito*	Tra le sedute n. All'interno del sito*	Tra Rgg all'interno del sito*	Tra i lotti del lotto all'interno del sito*	Tra operatori all'interno del sito*	Residuo*	Totale
C- Green	2xLoD	12ALA	84	32,13	(0,1578, 0,49%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2509, 0,78%)	(0,0745, 0,23%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1249, 0,39%)	(0,1362, 0,42%)	(0,3390, 1,06%)
		12ARG	84	31,61	(0,0882, 0,28%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2430, 0,77%)	(0,1339, 0,42%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2604, 0,82%)	(0,3828, 1,21%)
		12ASP	84	31,24	(0,1655, 0,53%)	(0,0391, 0,13%)	(0,2178, 0,70%)	(0,0600, 0,19%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2052, 0,66%)	(0,1426, 0,46%)	(0,3542, 1,13%)
		12CYS	84	32,15	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2836, 0,88%)	(0,0852, 0,26%)	(0,0940, 0,29%)	(0,1658, 0,52%)	(0,1318, 0,41%)	(0,3636, 1,13%)
		12SER	84	32,14	(0,1457, 0,45%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2659, 0,83%)	(0,1807, 0,56%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2715, 0,84%)	(0,1783, 0,55%)	(0,4554, 1,42%)
		12VAL	84	30,69	(0,0646, 0,21%)	(0,0480, 0,16%)	(0,2124, 0,69%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1031, 0,34%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2000, 0,65%)	(0,3143, 1,02%)
		13ASP	84	32,12	(0,2111, 0,66%)	(0,0000, 0,00%)	(0,3218, 1,00%)	(0,2966, 0,92%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1743, 0,54%)	(0,1980, 0,62%)	(0,5184, 1,61%)
		LoD		12ALA	119	32,93	(0,0000, 0,00%)	(0,1524, 0,46%)	(0,1821, 0,55%)	(0,1048, 0,32%)	(0,0757, 0,23%)	(0,1007, 0,31%)
12ARG	120			31,98	(0,0000, 0,00%)	(0,0743, 0,23%)	(0,1936, 0,61%)	(0,1262, 0,39%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1332, 0,42%)	(0,1619, 0,51%)	(0,3096, 0,97%)
12ASP	120			31,06	(0,1880, 0,61%)	(0,1184, 0,38%)	(0,1681, 0,54%)	(0,1033, 0,33%)	(0,1171, 0,38%)	(0,1481, 0,48%)	(0,1333, 0,43%)	(0,3511, 1,13%)
12CYS	120			33,19	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2513, 0,76%)	(0,0776, 0,23%)	(0,2128, 0,64%)	(0,1427, 0,43%)	(0,2712, 0,82%)	(0,4401, 1,33%)
12SER	120			33,13	(0,2194, 0,66%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2433, 0,73%)	(0,1263, 0,38%)	(0,1470, 0,44%)	(0,1973, 0,60%)	(0,2052, 0,62%)	(0,4437, 1,34%)
12VAL	120			31,65	(0,0000, 0,00%)	(0,1254, 0,40%)	(0,1645, 0,52%)	(0,1307, 0,41%)	(0,1271, 0,40%)	(0,0976, 0,31%)	(0,1792, 0,57%)	(0,3159, 1,00%)
13ASP	118			33,08	(0,0000, 0,00%)	(0,1789, 0,54%)	(0,1661, 0,50%)	(0,3569, 1,08%)	(0,0649, 0,20%)	(0,1565, 0,47%)	(0,2588, 0,78%)	(0,4894, 1,48%)

\*\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 29. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - riproducibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra siti*	Tra i giorni all'interno del sito*	Tra le sedute n. All'interno del sito*	Tra Rgg all'interno del sito*	Tra i lotti del lotto all'interno del sito*	Tra operatori all'interno del sito*	Residuo*	Totale
C1 Yellow	2ALOD	12ALA	84	<b>33,25</b>	(0,0706, 0,21%)	(0,0399, 0,12%)	(0,1314, 0,40%)	(0,1303, 0,39%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1124, 0,34%)	(0,1913, 0,58%)	(0,2883, 0,87%)
		12ARG	84	<b>33,07</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,1406, 0,43%)	(0,1353, 0,41%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2024, 0,61%)	(0,1262, 0,38%)	(0,2831, 0,86%)	(0,4016, 1,21%)
		12ASP	84	<b>32,98</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0480, 0,15%)	(0,1706, 0,52%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0797, 0,24%)	(0,1795, 0,54%)	(0,2616, 0,79%)
		12CYS	84	<b>33,20</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0976, 0,29%)	(0,1781, 0,54%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1454, 0,44%)	(0,1723, 0,52%)	(0,2939, 0,89%)
		12SER	84	<b>32,91</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,1101, 0,33%)	(0,0549, 0,17%)	(0,0669, 0,20%)	(0,0677, 0,21%)	(0,1186, 0,36%)	(0,2274, 0,69%)	(0,2916, 0,89%)
		12VAL	84	<b>33,17</b>	(0,0688, 0,21%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1896, 0,57%)	(0,0937, 0,28%)	(0,1140, 0,34%)	(0,1311, 0,40%)	(0,2605, 0,79%)	(0,3768, 1,14%)
		13ASP	84	<b>33,10</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0482, 0,15%)	(0,2035, 0,61%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0466, 0,14%)	(0,1460, 0,44%)	(0,1688, 0,51%)	(0,3019, 0,91%)
LoD		12ALA	119	<b>33,33</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2108, 0,63%)	(0,0820, 0,25%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1443, 0,43%)	(0,2253, 0,68%)	(0,3411, 1,02%)
		12ARG	120	<b>33,15</b>	(0,1092, 0,33%)	(0,0537, 0,16%)	(0,1605, 0,48%)	(0,0507, 0,15%)	(0,2157, 0,65%)	(0,1276, 0,39%)	(0,2180, 0,66%)	(0,3749, 1,13%)
		12ASP	120	<b>32,96</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0832, 0,25%)	(0,2022, 0,61%)	(0,0864, 0,26%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1117, 0,34%)	(0,2223, 0,67%)	(0,3343, 1,01%)
		12CYS	120	<b>33,26</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2232, 0,67%)	(0,1691, 0,51%)	(0,0789, 0,24%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2097, 0,63%)	(0,3516, 1,06%)
		12SER	120	<b>33,01</b>	(0,1573, 0,48%)	(0,0716, 0,22%)	(0,2134, 0,65%)	(0,0951, 0,29%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0784, 0,24%)	(0,1689, 0,51%)	(0,3263, 0,99%)
		12VAL	120	<b>33,25</b>	(0,1519, 0,46%)	(0,1960, 0,59%)	(0,1272, 0,38%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1298, 0,39%)	(0,0553, 0,17%)	(0,2162, 0,65%)	(0,3487, 1,05%)
13ASP	118	<b>33,16</b>	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1768, 0,53%)	(0,0998, 0,30%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1973, 0,59%)	(0,2802, 0,84%)		

\*\* SD, %CV

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 29. Componenti della varianza in termini di SD e %CV - riproducibilità (segue)**

Variabile di analisi	Livello del campione	Esame	Numero di osservazioni	Media	Tra siti*	Tra i giorni all'interno del sito*	Tra le sedute n. All'interno del sito*	Tra RGG all'interno del sito*	Tra i lotti del kit all'interno del sito*	Tra operatori all'interno del sito*	Residuo*	Totale
WT	12ALA	84	33,44	(0,1257, 0,38%)	(0,0961, 0,29%)	(0,1845, 0,55%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2083, 0,62%)	(0,3104, 0,93%)	
	12ARG	84	33,37	(0,1191, 0,36%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1869, 0,56%)	(0,1321, 0,40%)	(0,2529, 0,76%)	(0,1205, 0,36%)	(0,2132, 0,64%)	(0,4217, 1,26%)	
	12ASP	84	33,16	(0,0574, 0,17%)	(0,0738, 0,22%)	(0,2162, 0,65%)	(0,0563, 0,17%)	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1844, 0,56%)	(0,2997, 0,90%)	
	12CYS	84	33,42	(0,0000, 0,00%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1964, 0,59%)	(0,0720, 0,22%)	(0,1311, 0,39%)	(0,0262, 0,08%)	(0,2258, 0,68%)	(0,3287, 0,98%)	
	12SER	84	33,20	(0,0812, 0,24%)	(0,1331, 0,40%)	(0,1734, 0,52%)	(0,0329, 0,10%)	(0,0000, 0,00%)	(0,2009, 0,61%)	(0,1923, 0,58%)	(0,3535, 1,06%)	
	12VAL	84	33,41	(0,0000, 0,00%)	(0,0695, 0,21%)	(0,2046, 0,61%)	(0,0000, 0,00%)	(0,1708, 0,51%)	(0,1437, 0,43%)	(0,2339, 0,70%)	(0,3799, 1,14%)	
	13ASP	84	33,46	(0,0000, 0,00%)	(0,0613, 0,18%)	(0,1802, 0,54%)	(0,0744, 0,22%)	(0,0073, 0,02%)	(0,0969, 0,29%)	(0,1790, 0,53%)	(0,2816, 0,84%)	

## Variabilità nella gestione dei campioni

L'obiettivo di questo studio era valutare l'effetto della variabilità nella gestione dei campioni, in modo specifico dell'estrazione del DNA, sul *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Questo studio integra lo studio sulla ripetibilità e sulla riproducibilità, analizzando la variabilità nella gestione dei campioni quando le stesse sezioni cliniche FFPE e le stesse sezioni di linee cellulari FFPE sono state analizzate in 3 laboratori diversi con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

---

## CRC

Sono state ottenute trenta sezioni sequenziali di 5 µm l'una da ognuno dei 10 campioni FFPE di CRC (3 wild-type e 1 per ogni mutazione). Le sezioni sono state distribuite in modo casuale tra i 3 siti di analisi, in modo che ogni sito potesse ricevere 10 sezioni per campione FFPE (100 sezioni in totale). Su 300 estrazioni di DNA analizzate, 298 campioni sono risultati validi. La concordanza rispetto alle classificazioni delle mutazioni KRAS tra i 3 siti è stata del 99,33%.

Sulla base di un confronto sito per sito dei valori DCT medi per i campioni mutanti e wild-type, è stata evidenziata una ravvicinata concordanza tra i risultati. I risultati dimostrano la concordanza della procedura di estrazione del DNA e di elaborazione del campione in concomitanza con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

## NSCLC

Nello studio sono stati utilizzati 13 campioni clinici di NSCLC (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL e 3 wild-type) e 4 campioni di linee cellulari FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER e 13ASP). I campioni erano rappresentativi dei diversi metodi di acquisizione: resezione chirurgica, agoaspirato con ago sottile e agobiopsia con ago a scatto. Dove non erano disponibili campioni clinici di tessuto NSCLC, per rappresentare mutazioni rare sono state utilizzate linee cellulari.

I 3 batch costituiti da 20 sezioni FFPE sono quindi stati distribuiti in modo casuale ai 3 siti. In ognuno dei 3 siti, l'estrazione del DNA è stata eseguita su un batch di 20 sezioni FFPE (10 coppie) per mutazione e wild-type.

Quando tutte le preparazioni dei campioni nei 3 diversi siti di analisi sono state analizzate con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, ciascuna delle 7 mutazioni e i campioni wild-type sono stati classificati correttamente. Nel complesso i singoli campioni delle 7 mutazioni e i campioni wild-type sono stati classificati correttamente al 100% e ciò dimostra che l'estrazione del DNA e la rilevazione delle mutazioni tramite il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è omogenea e coerente tra i siti.

---

Un ulteriore studio sulla manipolazione dei campioni è stato condotto utilizzando campioni clinici FFPE di NSCLC rappresentativi delle mutazioni 12ALA, 12ARG, 12SER e 13ASP, poiché lo studio precedente aveva utilizzato campioni di linee cellulari rappresentativi di queste mutazioni. Questo ulteriore studio ha seguito lo stesso disegno dello studio precedente. Tutte le preparazioni dei campioni mutanti per 12ALA, 12ARG e 13ASP estratti in tutti e tre i singoli siti di analisi hanno fornito una classificazione della mutazione corretta quando analizzate con il kit KRAS. La classificazione corretta complessiva per questi campioni è stata del 100%. Le preparazioni dei campioni mutanti per 12SER hanno fornito una frequenza di classificazione delle mutazioni corretta di 28 su 30 (percentuale di classificazione corretta pari al 93,33%) in tutti e tre i singoli siti di analisi. I risultati sono coerenti in merito a procedura di estrazione del DNA e flusso di lavoro della processazione del campione utilizzato per eseguire test con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

## Equivalenza dei metodi di acquisizione dei campioni (solo NSCLC)

L'obiettivo di questo studio era valutare se la classificazione delle mutazioni per i campioni di NSCLC eseguita con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sia o meno influenzata dal metodo di acquisizione dei campioni. I 3 metodi di acquisizione valutati in questo studio sono: resezione, agoaspirato con ago sottile, agobiopsia con ago a scatto.

Per questo studio, campioni di agobiopsia e agoaspirato "dello stesso paziente" sono stati ottenuti da campioni tumorali acquisiti tramite resezione chirurgica, in modo da avere a disposizione campioni di uno stesso tumore con i 3 diversi metodi di acquisizione. Ogni campione è stato estratto e analizzato con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Ogni campione è stato estratto e analizzato con l'esame di controllo KRAS. Tutti i campioni che hanno generato un risultato valido (169 resezioni, 169 agobiopsie e 164 agoaspirati) sono stati analizzati con tutti e 8 gli esami KRAS.

L'analisi primaria si è basata sulla mutazione specifica rilevata tra i tipi di acquisizione. Sono stati calcolati i parametri di concordanza percentuale complessiva, concordanza percentuale di positività e concordanza percentuale di negatività, insieme al limite esatto di confidenza al 95% bilaterale per ogni confronto tra coppie.

**Tabella 30. Concordanza tra i metodi di acquisizione dei campioni**

<b>Confronto</b>	<b>Concordanza</b>	<b>Frequenze</b>	<b>Percentuale (%)</b>	<b>Limite inferiore di confidenza bilaterale</b>	<b>Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale</b>
CNB vs FNA con CNB di riferimento	Concordanza percentuale totale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Concordanza percentuale di positività	29/35	82,86	66,35	93,44
	Concordanza percentuale di negatività	119/121	98,35	94,16	99,80
CNB vs RES con CNB di riferimento	Concordanza percentuale totale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Concordanza percentuale di positività	31/37	83,78	67,99	93,81
	Concordanza percentuale di negatività	122/124	98,39	94,30	99,80
FNA vs CNB con FNA di riferimento	Concordanza percentuale totale	148/156	94,87	90,15	97,76
	Concordanza percentuale di positività	29/32	90,63	74,98	98,02
	Concordanza percentuale di negatività	119/124	95,97	90,84	98,68
FNA vs RES con FNA di riferimento	Concordanza percentuale totale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Concordanza percentuale di positività	30/32	93,75	79,19	99,23
	Concordanza percentuale di negatività	122/124	98,39	94,30	99,80

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

**Tabella 30. Concordanza tra i metodi di acquisizione dei campioni (segue)**

<b>Confronto</b>	<b>Concordanza</b>	<b>Frequenze</b>	<b>Percentuale (%)</b>	<b>Limite inferiore di confidenza bilaterale</b>	<b>Limite superiore di confidenza al 95% bilaterale</b>
RES v. CNB con RES di riferimento	Concordanza percentuale totale	153/161	95,03	90,44	97,83
	Concordanza percentuale di positività	31/34	91,18	76,32	98,14
	Concordanza percentuale di negatività	122/127	96,06	91,05	98,71
RES v. FNA con RES di riferimento	Concordanza percentuale totale	152/156	97,44	93,57	99,30
	Concordanza percentuale di positività	30/32	93,75	79,19	99,23
	Concordanza percentuale di negatività	122/124	98,39	94,30	99,80

Inoltre, è stata eseguita l'analisi di regressione di Passing-Bablok e Deming per confrontare i valori di  $C_T$  e  $\Delta C_T$  tra i diversi metodi di acquisizione dei campioni. L'analisi di regressione ha dimostrato che non vi sono prove che suggeriscano l'esistenza di una differenza costante o proporzionale tra i tipi di campioni RES, CNB e FNA in termini di  $C_T$  o  $\Delta C_T$ . È stata inoltre eseguita un'analisi di regressione lineare per esaminare l'effetto della percentuale di tessuto necrotico e tumorale sui valori  $\Delta C_T$  pertinenti. La pendenza della curva di regressione sia per il tessuto necrotico che per la percentuale di tumore rispetto a  $\Delta C_T$  indica che non vi sono prove che suggeriscano una differenza significativa nei valori  $\Delta C_T$  con l'aumento dei valori della percentuale di tessuto necrotico o tumorale.

## Prestazioni cliniche

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è progettato per la rilevazione specifica di 7 mutazioni KRAS nei codoni 12 e 13 del gene KRAS. Non è progettato per rilevare specificamente la sequenza wild-type in corrispondenza di questi codoni. I risultati del test sono riportati come “[mutation name] Detected” ([nome della mutazione] rilevata) e “No Mutation Detected” (Nessuna mutazione rilevata). Negli studi clinici presentati di seguito, i risultati positivi alla mutazione KRAS appartengono a quei pazienti il cui tessuto tumorale è risultato positivo per una o più delle 7 mutazioni rilevate dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D). I risultati negativi alla mutazione KRAS (wild-type) si riferiscono a quei pazienti il cui tessuto tumorale è risultato negativo per le 7 mutazioni rilevate dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (vale a dire che il campione può, in effetti, portare mutazioni nel gene KRAS non identificate dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit).

### Studio clinico a supporto dell'uso con Erbitux (cetuximab)

È stato condotto uno studio delle prestazioni cliniche per generare dati a sostegno dell'utilità clinica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit come strumento diagnostico che consente di selezionare i pazienti per il trattamento con Erbitux (cetuximab). La sicurezza e l'efficacia di Erbitux (cetuximab) sono state dimostrate nello studio CA225025. CA225025 era una sperimentazione clinica multicentrica, in aperto, randomizzata, condotta su 572 pazienti con CRC metastatico (mCRC) recidivante, con espressione dell'EGFR, precedentemente trattati. I pazienti sono stati randomizzati (1:1) a ricevere Erbitux (cetuximab) più la migliore terapia di supporto (BSC) o la sola BSC. Erbitux (cetuximab) è stato somministrato a una dose iniziale di 400 mg/m<sup>2</sup>, seguita da 250 mg/m<sup>2</sup> settimanalmente fino a progressione della malattia o tossicità inaccettabile.

Dei 572 pazienti randomizzati, l'età mediana era di 63 anni; il 64% era di sesso maschile, l'89% era di etnia caucasica e il 77% presentava uno stato di performance ECOG di 0-1 al basale. I dati demografici e le caratteristiche al basale erano simili tra i bracci dello studio. Tutti i pazienti dovevano aver ricevuto e aver manifestato progressione con una terapia precedente, tra cui un regime contenente irinotecan e un regime contenente oxaliplatino.

Lo stato della mutazione *KRAS* è stato disponibile per 453 su 572 (79%) pazienti: 245 (54%) pazienti presentavano tumori negativi alla mutazione *KRAS* e 208 (46%) pazienti presentavano tumori positivi alla mutazione *KRAS*, valutati con il *therascreen KRAS RGQ PCR Kit*.

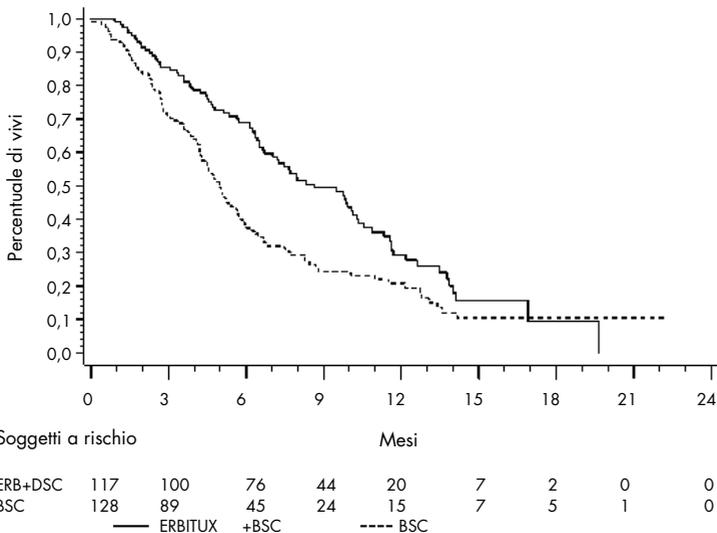
La principale misura di esito dello studio era la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS). Per la popolazione negativa alla mutazione *KRAS* (wild-type), il tempo di sopravvivenza mediano (IC al 95%) è stato di 8,6 (7,0, 10,3) mesi nel gruppo che ha ricevuto Erbitux (cetuximab)+BSC e di 5,0 (4,3, 5,7) mesi nel gruppo che ha ricevuto BSC. Il rapporto di rischio della OS di Erbitux (cetuximab)+BSC rispetto a BSC è stato di 0,63. L'intervallo di confidenza (IC) al 95% era (0,47, 0,84).

Per la popolazione positiva alla mutazione *KRAS*, la sopravvivenza mediana è stata di 4,8 (3,9, 5,6) mesi nel gruppo che ha ricevuto Erbitux (cetuximab)+BSC e di 4,6 (3,6, 4,9) mesi nel gruppo che ha ricevuto BSC. Il rapporto di rischio era 0,91 con IC al 95% (0,67, 1,24). I risultati sono presentati nelle Tabella 31 e Figura 23.

**Tabella 31. Sopravvivenza complessiva nel carcinoma coloretale metastatico con espressione di EGFR precedentemente trattato (tutti i randomizzati e stato *KRAS*)**

	Tutti i randomizzati		Negativo alla mutazione <i>KRAS</i> wild-type		Positivo alla mutazione <i>KRAS</i>	
	Erbitux+BSC N=287	BSC N=285	Erbitux+BSC N=117	BSC N=128	Erbitux+BSC N=108	BSC N=100
<b>Mediana (mesi) (IC 95%)</b>	6,1 (5,4, 6,7)	4,6 (4,2, 4,9)	8,6 (7,0, 10,3)	5,0 (4,3, 5,7)	4,8 (3,9, 5,6)	4,6 (3,6, 4,9)
<b>Rapporto di rischio (IC 95%)</b>	0,77 (0,64, 0,92)		0,63 (0,47, 0,84)		0,91 (0,67, 1,24)	
<b>Valore p*</b>	0,0046		-		-	

\* Sulla base del test log-rank stratificato.



**Figura 23. Curva di Kaplan-Meier per la sopravvivenza globale nei pazienti con carcinoma coloretale metastatico negativo alla mutazione KRAS (wild-type).**

I tassi di sopravvivenza globale basati sulle stime di Kaplan-Meier a 6 e 12 mesi sono stati più alti per il gruppo che ha ricevuto Erbitux (cetuximab)+BSC rispetto al gruppo che ha ricevuto BSC per il sottogruppo KRAS wild-type. Questo vantaggio non è stato osservato nel sottogruppo con mutazione KRAS.

### Studio clinico a supporto dell'uso con Vectibix (panitumumab)

È stato condotto uno studio delle prestazioni cliniche per generare dati a sostegno dell'utilità clinica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit come strumento diagnostico che aiuta a identificare pazienti per il trattamento con Vectibix (panitumumab). L'obiettivo dello studio era quello di valutare se lo stato della mutazione KRAS, determinato dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, possa essere utilizzato per selezionare i pazienti con mCRC che beneficeranno del trattamento con Vectibix (panitumumab). La sperimentazione clinica 20050203 era uno studio di fase 3, multicentrico, prospettico, in aperto, randomizzato per valutare l'efficacia di panitumumab in

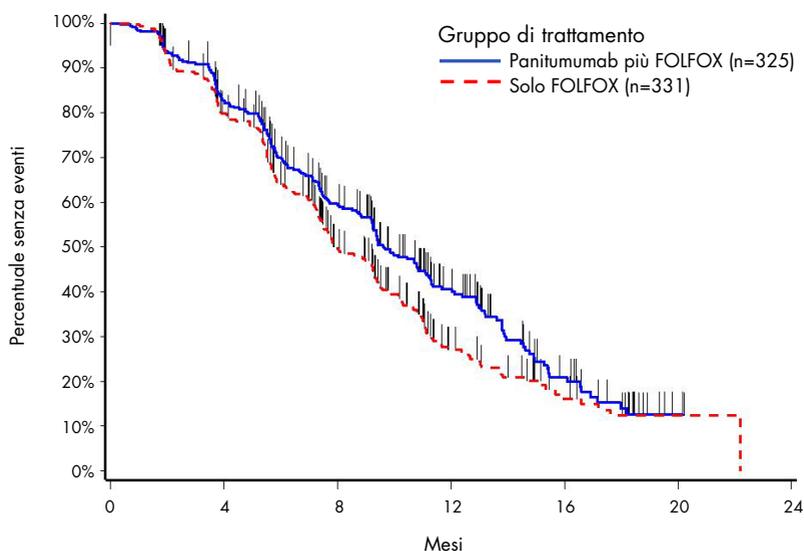
combinazione con oxaliplatino, 5-fluorouracile (5-FU) e leucovorina (FOLFOX) rispetto al solo FOLFOX in pazienti con mCRC recidivante precedentemente non trattato.

I campioni di tumore raccolti dai pazienti dello studio 20050203 sono stati analizzati con il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per identificare due sottogruppi: positivi alla mutazione KRAS (KRAS mutante) e negativi alla mutazione KRAS (KRAS wild-type), a seconda che sia stata rilevata almeno una o nessuna delle 7 mutazioni KRAS nei codoni 12 e 13 dell'esone 2 del gene KRAS. Nelle analisi retrospettive, i dati di efficacia dello studio 20050203 sono stati stratificati per sottogruppo KRAS. L'obiettivo primario dell'analisi di KRAS era valutare se il miglioramento complessivo della PFS per Vectibix (panitumumab) più FOLFOX rispetto al solo FOLFOX fosse significativamente maggiore tra i soggetti con tumori KRAS wild-type rispetto ai soggetti con tumori KRAS mutanti.

L'endpoint di efficacia primaria preimpostato era la sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival, PFS) nel gruppo di pazienti (n = 656) con mCRC KRAS wild-type, valutato da una revisione centrale in cieco indipendente delle immagini. Altri endpoint di efficacia chiave sono stati la OS e l'ORR. I risultati dell'efficacia nei pazienti con mCRC KRAS wild-type sono presentati nella Tabella 32 e nella Figura 24.

**Tabella 32. Risultati dell'efficacia in pazienti con mCRC KRAS wild-type**

	Popolazione KRAS wild- type	PFS			ORR (IC 95%)
		Mediana (mesi) (IC 95%)	Rapporto di rischio (IC 95%)	Valore p	
<b>Panitumumab più FOLFOX</b>	N=325	9,6 (9,2, 11,1)	0,80 (0,66, 0,97)	0,02	54% (48%, 59%)
<b>Solo FOLFOX</b>	N=331	8,0 (7,5, 9,3)			47% (41%, 52%)



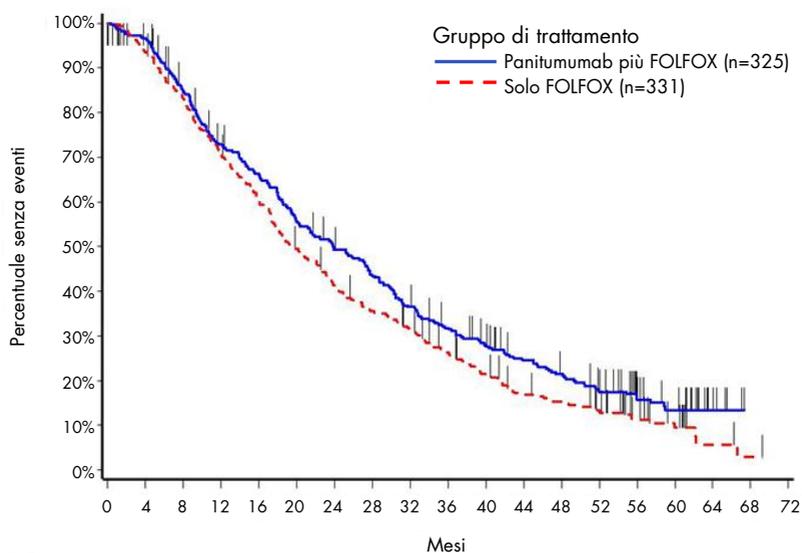
#### Soggetti a rischio

Panitumumab più FOLFOX	325	254	156	73	22	1	0
Solo FOLFOX	331	242	127	41	16	2	0

**Figura 24.** Grafico di Kaplan-Meier della sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival, PFS) nei pazienti con mCRC *KRAS* wild-type.

Tra i pazienti con tumori *KRAS* mutanti, la PFS mediana è stata di 7,3 mesi (IC al 95%: 6,3, 8,0) nei 221 pazienti che hanno ricevuto Vectibix (panitumumab) più FOLFOX rispetto alla PFS mediana di 8,8 mesi (IC al 95%: 7,7, 9,4) nei 219 pazienti che hanno ricevuto il solo FOLFOX (HR = 1,29, IC al 95%: 1,04, 1,62). La OS mediana è stata di 15,5 mesi (IC al 95%: 13,1, 17,6) nei pazienti che hanno ricevuto Vectibix (panitumumab) più FOLFOX rispetto alla OS mediana di 19,3 mesi (IC al 95%: 16,5, 21,8) nei pazienti che hanno ricevuto il solo FOLFOX (HR = 1,24, IC al 95%: 0,98, 1,57).

Un'analisi esplorativa della OS con informazioni aggiornate basate sugli eventi nell'82% dei pazienti con mCRC KRAS wild-type ha stimato l'effetto del trattamento con Vectibix (panitumumab) più FOLFOX rispetto al solo FOLFOX. La OS mediana di 325 pazienti con mCRC KRAS wild-type che hanno ricevuto Vectibix (panitumumab) più FOLFOX è stata di 23,8 mesi (IC al 95%: 20,0, 27,7) rispetto a 19,4 mesi (IC al 95%: 17,4, 22,6) tra i 331 pazienti che hanno ricevuto il solo FOLFOX (HR = 0,83, IC al 95%: 0,70, 0,98). I risultati sono riportati nella Figura 25.



**Soggetti a rischio**

Panitumumab più FOLFOX	325	310	266	227	205	172	151	132	111	94	78	63	54	42	25	17	6	0	0
Solo FOLFOX	331	304	267	226	191	157	129	111	96	77	61	45	40	32	17	10	3	1	0

**Figura 25.** Grafico di Kaplan-Meier della sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) nei pazienti con mCRC KRAS wild-type.

## Studio clinico a supporto dell'uso di LUMYKRAS® (sotorasib)

È stato condotto uno studio di prestazione clinica per dimostrare la validità clinica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit come strumento diagnostico per aiutare l'identificazione di pazienti con NSCLC positivo a KRAS G12C per il trattamento con LUMYKRAS (sotorasib). L'obiettivo dello studio era quello di valutare se lo stato della mutazione G12C, determinato dal *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit possa essere utilizzato per selezionare i pazienti con NSCLC avanzato che beneficeranno del trattamento con LUMYKRAS (sotorasib). La sperimentazione clinica 20170543 era uno studio di fase 1/2, multicentrico, in aperto, progettato per valutare l'efficacia e la sicurezza di LUMYKRAS (sotorasib) in soggetti adulti con tumori solidi avanzati che presentano la mutazione KRAS G12C.

I dati dell'analisi primaria della parte di fase 2 di questo studio sul NSCLC sono stati utilizzati per sostenere la validità clinica del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit come strumento diagnostico.

L'arruolamento si è limitato ai soggetti con NSCLC con mutazione KRAS G12C, valutato da un risultato di laboratorio locale, che è stato confermato da un'analisi a livello centrale eseguita utilizzando il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. L'endpoint primario della parte di fase 2 di questo studio sul NSCLC era quello di valutare il tasso di risposta obiettiva (Objective Response Rate, ORR) del tumore, valutato secondo i criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST), versione 1.1, di LUMYKRAS (sotorasib) in monoterapia in soggetti con tumori avanzati che presentano la mutazione KRAS G12C.

Su un totale di 126 soggetti con NSCLC, 124 sono stati inclusi nel gruppo completo di analisi. Due soggetti sono stati esclusi perché non presentavano  $\geq 1$  lesione misurabile secondo la revisione centrale in cieco indipendente (Blinded Independent Central Review, BICR).

L'endpoint primario dell'ORR (risposta completa + risposta parziale) misurata mediante tomografia computerizzata o risonanza magnetica per immagini e valutata secondo RECIST 1.1 dal laboratorio BICR per i soggetti con NSCLC che presenta la mutazione KRAS G12C è stato del 37,1% (46 su 124 soggetti; IC al 95%: 28,6-46,2%); tre (3) soggetti (2,4%) hanno ottenuto una risposta completa e 43 soggetti (34,7%) una risposta parziale\*.

\* Sulla base del cut-off dei dati al 01 dicembre 2020.

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare il sito del nostro centro di assistenza tecnica [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (per informazioni di contatto, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Commenti e suggerimenti

---

### Risultati non validi

- |   |   |
|---|---|
| a) Le condizioni di conservazione di uno o più componenti del kit non sono conformi alle istruzioni fornite nel paragrafo Raccolta dei campioni, preparazione per l'analisi e conservazione, a pagina 17. | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo kit.   |
| b) Il <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit è scaduto.  | Controllare le condizioni di conservazione e la data di scadenza (vedere l'etichetta del kit) dei reagenti e, se necessario, utilizzare un nuovo <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit. |

### I campioni NTC generano risultati positivi nel canale FAM.

- |   |  |
|---|--|
| Si è verificata una contaminazione durante la preparazione della PCR. | Ripetere la PCR in replicati con reagenti nuovi.<br>Se possibile, chiudere le provette per PCR subito dopo l'aggiunta del campione da testare.<br>Assicurarsi che lo spazio di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari. |
|---|--|

## Avvisi generati dal software *therascreen* KRAS Assay Package

Nella Tabella 33 sono elencati i possibili avvisi che potrebbero essere generati dal software *therascreen* KRAS Assay Package, il loro significato e le azioni da intraprendere. Gli errori sono rilevanti sia per il NSCLC che per il CRC.

**Tabella 33. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Seduta PCR non valida: valore C <sub>T</sub> FAM fuori intervallo per il controllo positivo nella reazione di controllo	Ripetere l'intera seduta PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Seduta PCR non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo positivo (miscela reazione di mutazione)	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Seduta PCR non valida: controllo interno al di sopra dell'intervallo per il controllo negativo	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Seduta PCR non valida: controllo interno al di sotto dell'intervallo per il controllo negativo	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INVALID_CT	Seduta PCR non valida: valore FAM non valido (inferiore al limite) per il controllo negativo	Ripetere l'intera seduta PCR.
NTC_INVALID_DATA	Seduta PCR non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo negativo	Ripetere l'intera seduta PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Campione non valido: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo del campione	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi sui campioni interessati.

La Tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della Tabella dalla pagina precedente

**Tabella 33. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Campione non valido: valore $C_T$ FAM troppo basso nel controllo del campione	Diluire il campione per aumentare il valore $C_T$ del controllo. La diluizione dovrebbe essere calcolata sulla base del dato che, diluendo con rapporto 1:1 con l'acqua contenuta nel kit, il valore $C_T$ aumenterà di 1,0. Dopo aver diluito il campione, allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Campione non valido: valore $C_T$ FAM troppo alto nella reazione di controllo del campione	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE ( $\geq 4$ sezioni). Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.

## Errori specifici per NSCLC

La Tabella 34 elenca i possibili errori che potrebbero essere generati dal Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, il loro significato e le azioni da intraprendere per i campioni NSCLC.

**Tabella 34. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package per i campioni NSCLC**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valore C <sub>T</sub> troppo alto (o C <sub>T</sub> non disponibile) per il controllo interno (HEX), negativo alla mutazione nel canale FAM	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Provetta mutazione non valida: valore C <sub>T</sub> HEX troppo basso per il campione (controllo interno)	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

**Tabella 34. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package per i campioni NSCLC**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
SAMPLE_INVALID_DATA	Provetta mutazione non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo interno	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.
MUTATION_EARLY_CT	Provetta mutazione non valida: valore C <sub>T</sub> FAM troppo basso per il campione.	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Una o più mutazioni per un campione sono valide e positive; allo stesso tempo, una o più mutazioni per lo stesso campione sono non valide (avvertenza, non errore)	Allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.

## Errori specifici per CRC

La tabella seguente elenca i possibili errori che potrebbero essere generati dal Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, il loro significato e le azioni da intraprendere per i campioni CRC.

**Tabella 35. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package per i campioni CRC**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Valore $C_T$ troppo alto (o $C_T$ non disponibile) per il controllo interno (HEX), negativo alla mutazione nel canale FAM	<p>Se lo stato del campione è valido: nessuna azione.</p> <p>Se lo stato del campione non è valido, allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Provetta mutazione non valida: valore $C_T$ HEX troppo basso per il campione (controllo interno)	<p>Se lo stato del campione è valido: nessuna azione.</p> <p>Se lo stato del campione non è valido, allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

**Tabella 35. Significati e azioni consigliate per gli errori del Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package per i campioni CRC (segue)**

<b>Errore</b>	<b>Significato</b>	<b>Azione</b>
SAMPLE_INVALID_DATA	Provetta mutazione non valida: impossibile interpretare i dati di fluorescenza nel controllo interno	<p>Se lo stato del campione è valido: nessuna azione.</p> <p>Se lo stato del campione non è valido, allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Provetta mutazione non valida: valore C <sub>T</sub> FAM troppo basso per il campione.	<p>Se lo stato del campione è valido: nessuna azione.</p> <p>Se lo stato del campione non è valido, allestire una nuova seduta PCR per ripetere l'analisi. Se anche la seduta PCR ripetuta genera un risultato non valido, estrarre il campione da una nuova sezione FFPE. Allestire una nuova seduta PCR per eseguire i test sulla nuova estrazione. Se il risultato non è valido, ripetere il test anche per la seconda estrazione. Se il campione non genera un risultato valido neppure con questa seduta, viene assegnato uno stato mutazionale indeterminato e vengono sconsigliati ulteriori test.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Una o più mutazioni per un campione sono valide e positive; allo stesso tempo, una o più mutazioni per lo stesso campione sono non valide (avvertenza, non errore)	Nessuna.

---

## Controllo di qualità

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

# Bibliografia

## Citazioni bibliografiche

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

## Riferimenti utili

- Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.
- Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
- Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

- Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.
- Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.
- Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.
- Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.
- Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

- 
- Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.
  - Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
  - Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.
  - Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* 120, 1145.
  - Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
  - Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
  - Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

# Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:



Marchio per la Comunità Europea



<N>

Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni



Data di scadenza



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Numero di catalogo



Numero di lotto



Numero di materiale



Contiene



Numero

Rn

R indica la revisione del manuale e n il numero della revisione



Limite di temperatura



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



Attenzione

## Informazioni di contatto

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, chiamare il numero 00800-22-44-6000, o contattare uno dei reparti di assistenza tecnica QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro della copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Appendice 1: protocollo del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit per la procedura manuale

Questa sezione contiene istruzioni per l'uso del *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit con il software RGQ versione 2.3 in modalità aperta, vale a dire senza KRAS Assay Package.

## Informazioni generali

- Per i materiali richiesti, vedere Materiale necessario ma non in dotazione.
- Per istruzioni complete sulla preparazione e sulla configurazione dei campioni, vedere Protocollo: valutazione del campione di DNA e Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS.

## Protocollo: creazione di un profilo termico

Prima di iniziare è necessario creare un profilo termico per l'analisi KRAS. I parametri di ciclaggio sono gli stessi descritti per le procedure di valutazione del campione e delle mutazioni.

## Procedura

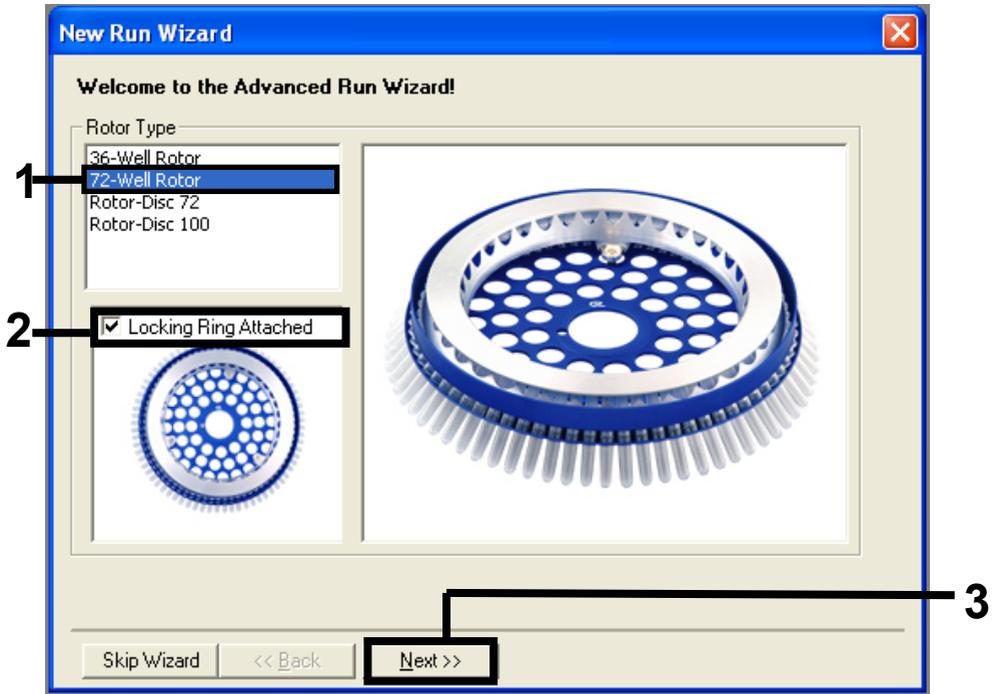
I parametri di ciclaggio sono riportati nella Tabella 36.

**Tabella 36. Parametri di ciclaggio**

Cicli	Temperatura	Durata	Acquisizione di dati
1	95°C	15 minuti	Nessuna
40	95°C	30 secondi	Nessuna
	60°C	60 secondi	Verde e giallo

1. Fare doppio clic sull'icona del software Rotor-Gene Q Series 2.3 sul desktop del computer portatile collegato allo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Selezionare la scheda "Advanced" (Avanzate) nella finestra "New Run" (Nuova seduta) che viene visualizzata.

2. Per creare un nuovo modello selezionare Empty Run (Seduta vuota), quindi fare clic su New (Nuova) per avviare New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo).
3. Come tipo di rotore selezionare "72-Well Rotor" ("Rotore a 72 pozzetti"). Confermare che l'anello di bloccaggio è montato selezionando la casella Locking Ring Attached (Anello di bloccaggio collegato). Fare clic su Next (Avanti) (Figura 26).



**Figura 26. Campo New Run Wizard (Procedura guidata nuovo processo).** 1 = "Rotor Type" (Tipo rotore); 2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato); 3 = "Next" (Avanti).

4. Immettere il nome dell'operatore. Aggiungere eventuali note e immettere 25 come volume della reazione. Verificare che il campo Sample Layout (Configurazione campioni) contenga il valore 1, 2, 3.... Fare clic su Next (Avanti) (Figura 27).

**New Run Wizard**

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

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

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

Skip Wizard << Back Next >>

**Figura 27. Immissione del nome dell'operatore e dei volumi delle reazioni.** 1 = campo "Operator" (Operatore); 2 = campo "Notes" (Annotazioni); 3 = campo "Reaction Volume" (Volume reazione); 4 = "Sample Layout" (Configurazione campioni); 5 = "Next" (Avanti).

5. Fare clic su "Edit Profile" (Modifica profilo) nella finestra "New Run Wizard" (Procedura guidata nuovo processo) (Figura 28), quindi programmare il profilo termico in base alle informazioni fornite nei seguenti passaggi.

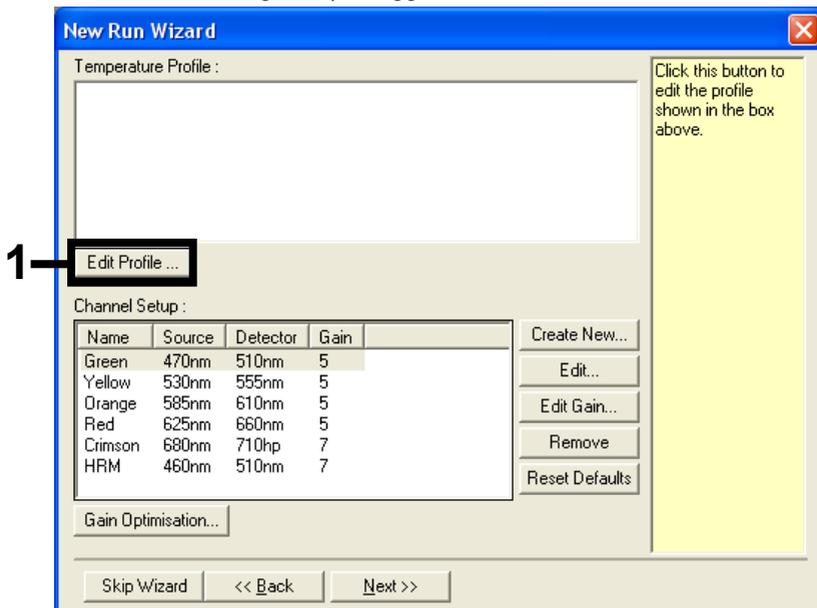
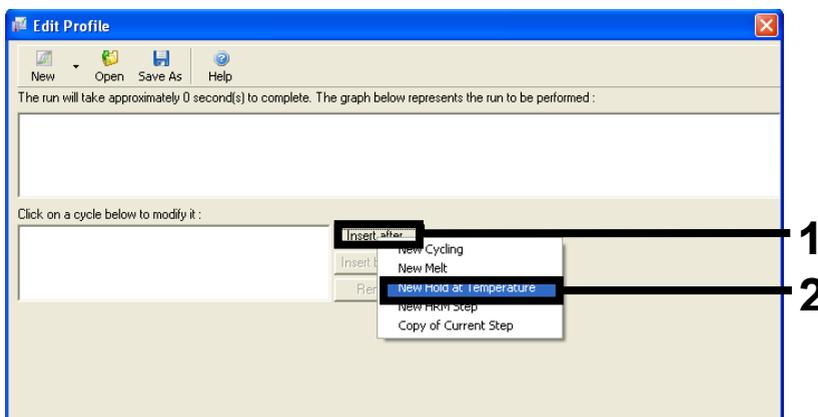


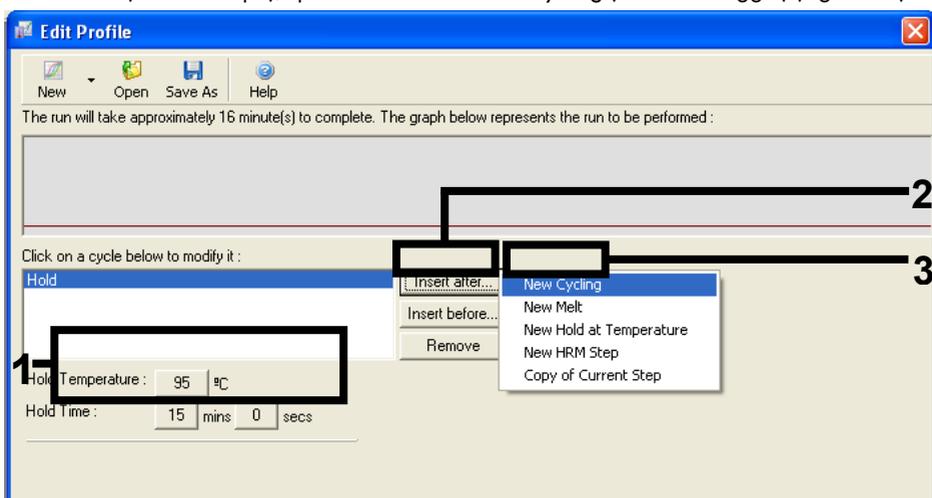
Figura 28. Modifica del profilo.

6. Fare clic su Insert after (Inserisci dopo), quindi selezionare New Hold at Temperature (Nuova sospensione alla temperatura) (Figura 29).



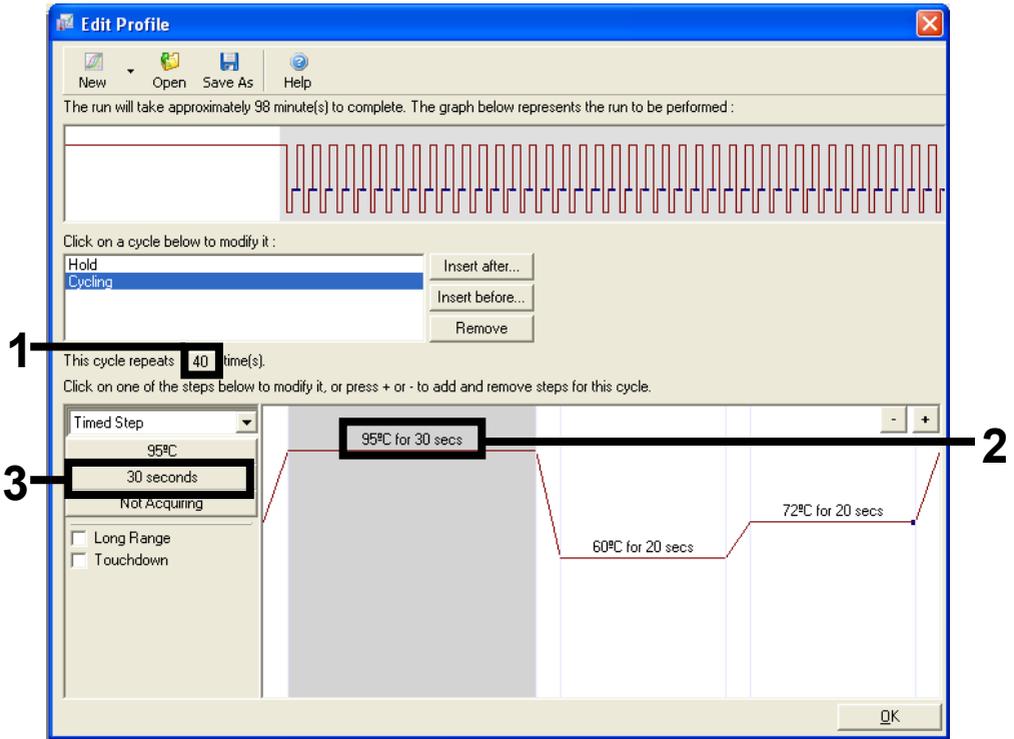
**Figura 29. Aggiunta di una fase di incubazione iniziale.** 1 = "Insert after" (Inserisci dopo); 2 = "New Hold at Temperature" (Nuova sospensione alla temperatura).

7. Impostare il valore nel campo Hold Temperature (Temperatura di sospensione) su 95°C e il campo Hold Time (Durata sospensione) su 15 mins 0 secs (15 minuti, 0 secondi). Fare clic su Insert after (Inserisci dopo), quindi selezionare New Cycling (Nuovo ciclaggio) (Figura 30).



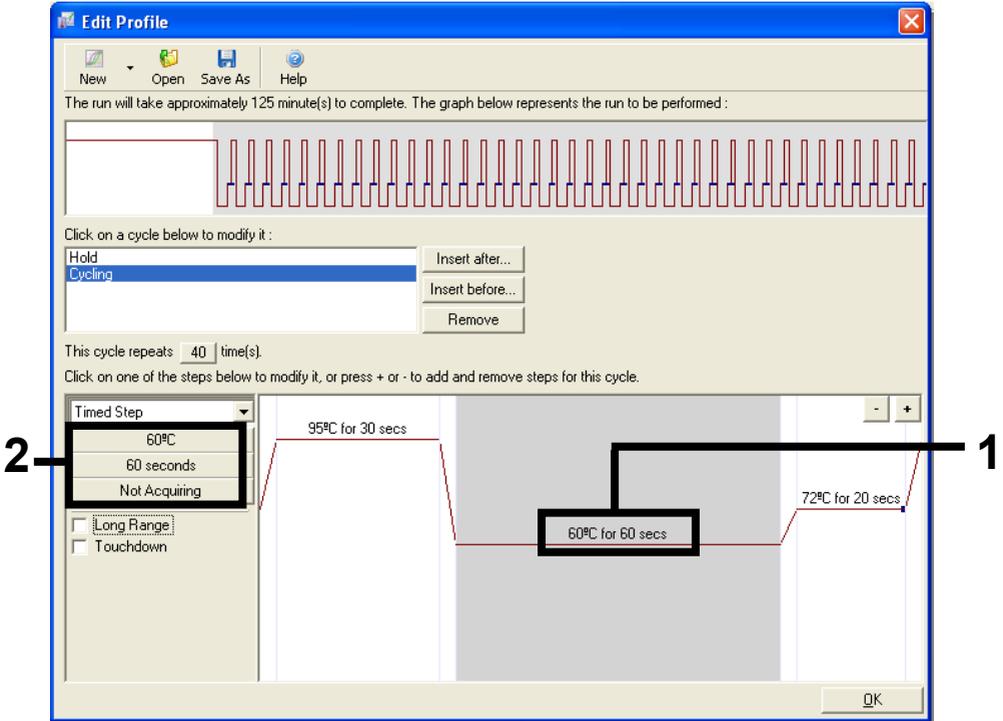
**Figura 30. Passaggio di incubazione iniziale a 95°C.** 1 = "Hold Temperature" (Temperatura di sospensione) e "Hold Time" (Durata sospensione); 2 = "Insert after" (Inserisci dopo); 3 = "New Cycling" (Nuovo ciclaggio).

8. Impostare 40 come numero di ripetizioni del ciclo. Selezionare il primo passaggio e impostare su 95°C for 30 secs (95°C per 30 secondi) (Figura 31).



**Figura 31. Passaggio di ciclaggio a 95°C.** 1 = casella "Cycle repeats"(Ripetizioni ciclo); 2 = impostazione della temperatura del primo passaggio; 3 = impostazione della durata del primo passaggio.

9. Evidenziare il secondo passaggio e impostare su 60°C for 60 secs (60°C per 60 secondi). Per abilitare l'acquisizione di dati in questo passaggio, selezionare "Not Acquiring" (No acquisizione) (Figura 32).



**Figura 32. Passaggio di ciclaggio a 60°C.** 1 = impostazione della temperatura e della durata del secondo passaggio; 2 = "Not Acquiring" (No acquisizione).

10. Nell'elenco Available Channels (Canali disponibili), selezionare Green e Yellow quindi fare clic su > per spostarli nell'elenco Acquiring Channels (Canali di acquisizione). Fare clic su OK (Figura 33).

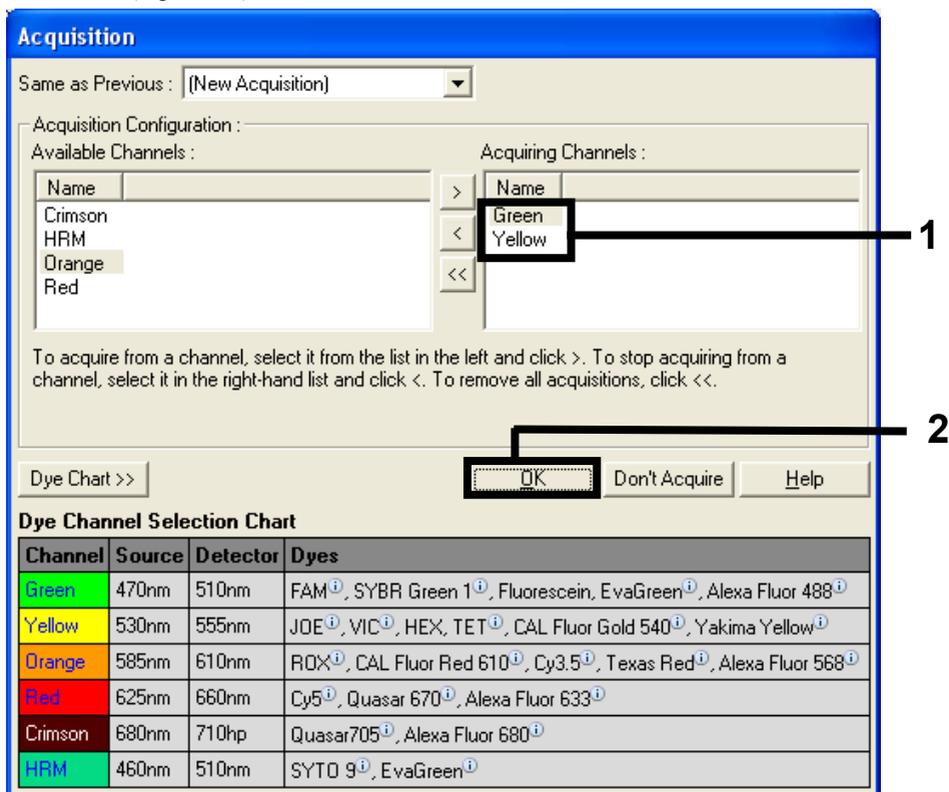


Figura 33. Acquisizione durante la fase di ciclaggio a 60°C.

11. Evidenziare il terzo passaggio e fare clic su - per eliminare. Fare clic su OK (Figura 34).

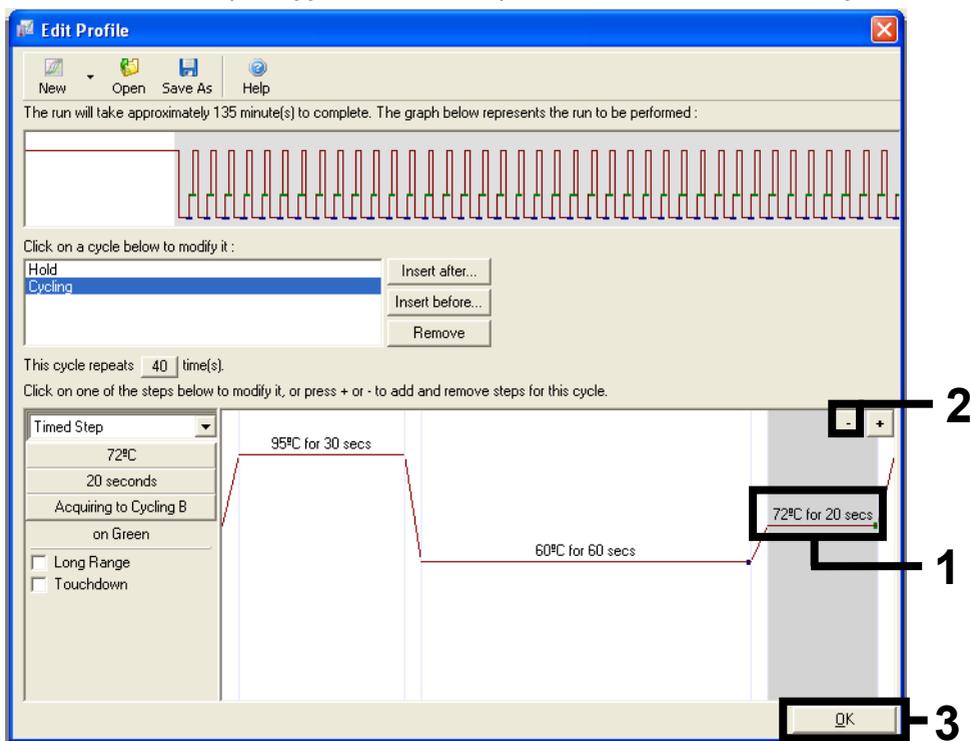


Figura 34. Rimozione del passaggio di estensione.

12. Nella finestra di dialogo successiva fare clic su Gain Optimization (Ottimizzazione del gain) (Figura 35).

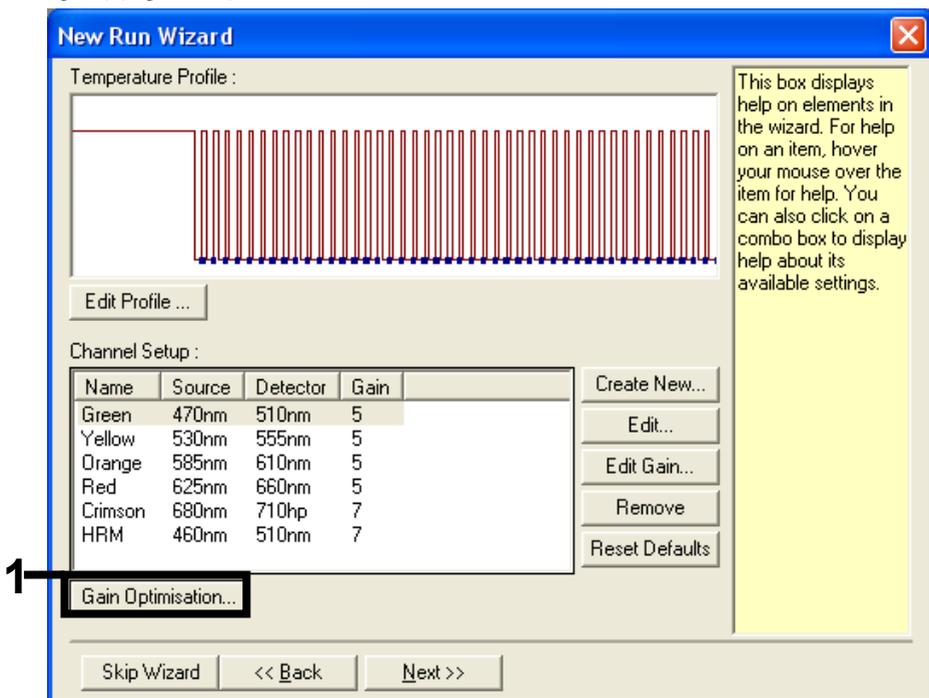


Figura 35. Ottimizzazione del gain.

13. Fare clic su Optimize Acquiring (Ottimizza acquisizione). Per ogni canale vengono visualizzate le impostazioni corrispondenti. Fare clic su OK per accettare questi valori predefiniti. (Figura 36).

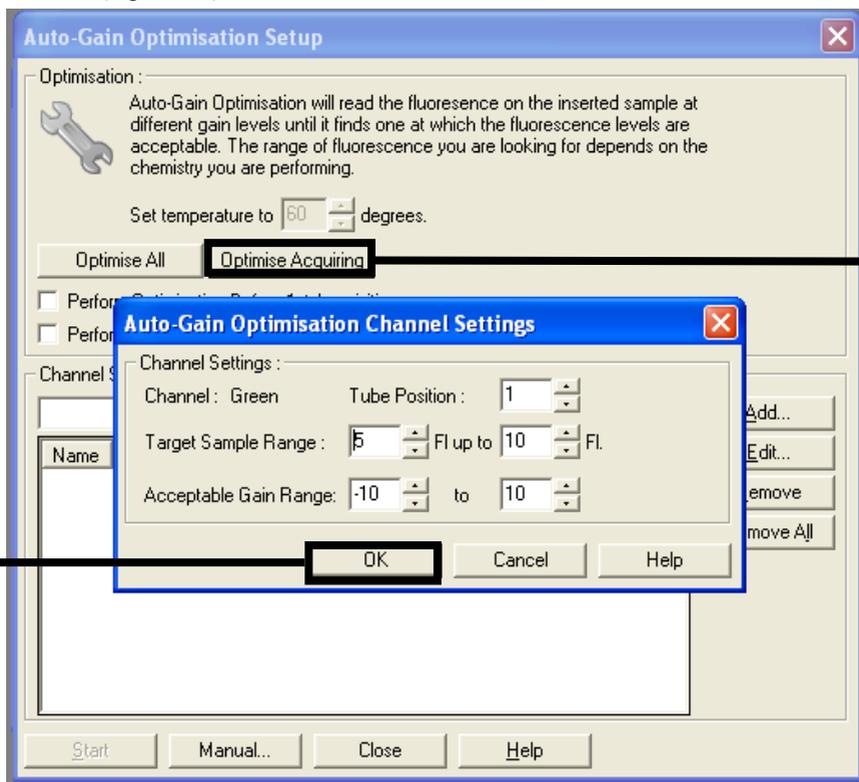


Figura 36. Ottimizzazione automatica del gain per il canale verde.

14. Selezionare la casella Perform Optimization before 1st Acquisition (Esegui ottimizzazione prima della 1a acquisizione), quindi fare clic su "Close" (Chiudi) per tornare alla procedura guidata (Figura 37).

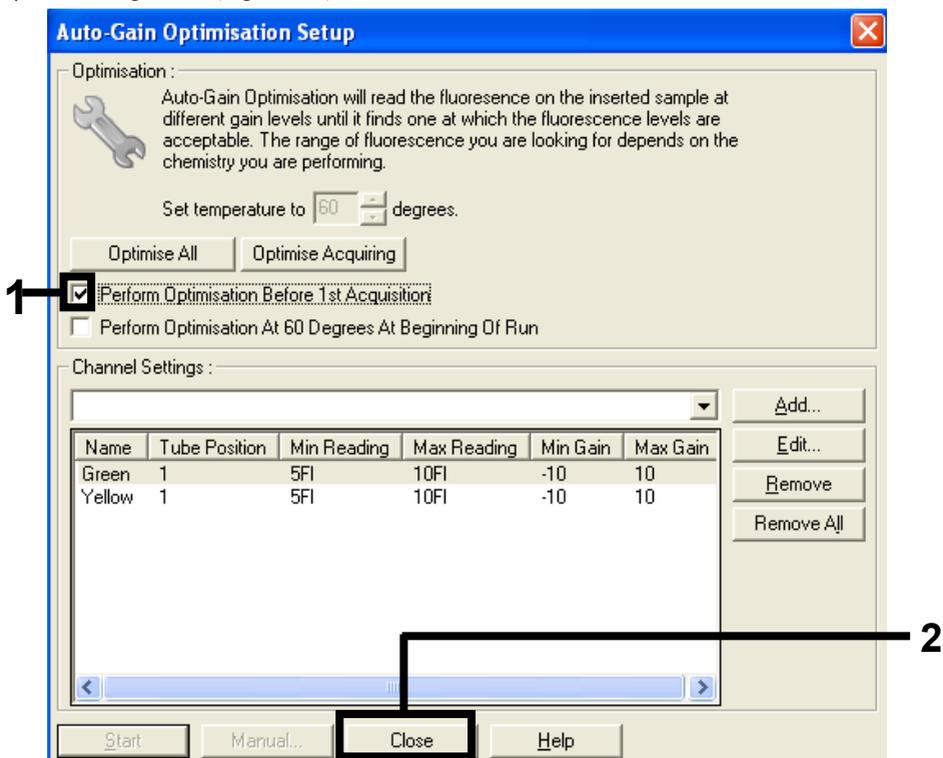


Figura 37. Selezione dei canali verde e giallo.

15. Fare clic su Next (Avanti). Quindi, fare clic su Save (Salva) per salvare il modello in un percorso appropriato.

---

### Protocollo: valutazione dei campioni (manuale)

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

- Preparare i campioni secondo le modalità descritte in Protocollo: valutazione del campione di DNA.
- Configurare la seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM5plex HRM come descritto in Protocollo: configurazione di *therascreen* KRAS PCR RGQ.
- Al termine della seduta, analizzare i dati seguendo le istruzioni contenute nella sezione Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni.

### Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS (manuale)

Se supera la valutazione, il campione può essere analizzato al fine di rilevare eventuali mutazioni KRAS.

- Preparare i campioni secondo le modalità descritte in Protocollo: valutazione del campione di DNA.
- Configurare la seduta PCR sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM5plex HRM come descritto in Protocollo: configurazione di *therascreen* KRAS PCR RGQ.
- Al termine della seduta, analizzare i dati seguendo le istruzioni contenute nella sezione Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni.

Protocollo: configurazione di *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. Avviare il software Rotor-Gene Q serie 2.3 e aprire il profilo termico creato appropriato.
2. Creare il profilo termico facendo riferimento al protocollo: creazione di un profilo termico.

Verificare che sia selezionato il rotore corretto e selezionare la casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato). Fare clic su "Next" (Avanti) (Figura 38).

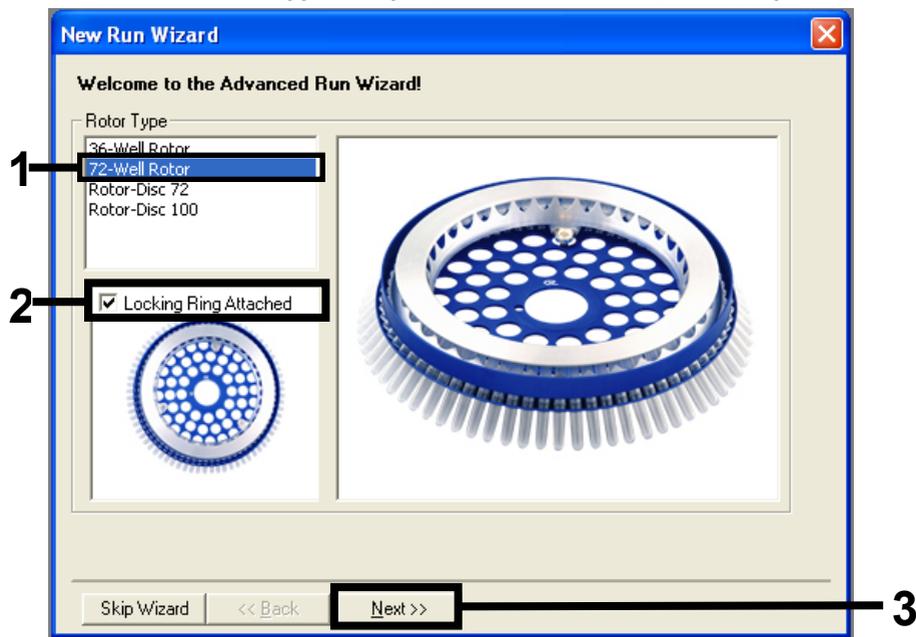


Figura 38. Campo "New Run Wizard" (Procedura guidata nuovo processo) e schermata di benvenuto. 1 = "Rotor Type" (Tipo rotore); 2 = casella "Locking Ring Attached" (Anello di bloccaggio collegato); 3 = "Next" (Avanti).

3. Immettere il nome dell'operatore. Aggiungere eventuali note, controllare che il campo Reaction Volume (Volume di reazione) sia impostato su 25 e che nella casella Sample Layout (Configurazione campioni) sia indicato 1, 2, 3.... Fare clic su Next (Avanti) (Figura 39).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. The title bar is blue with the text 'New Run Wizard' and a close button. The main area is light gray and contains several fields: 'Operator:' with a text box containing 'NAME', 'Notes:' with a large empty text area, 'Reaction Volume (µL):' with a spinner box set to '25', and 'Sample Layout:' with a dropdown menu showing '1, 2, 3...'. At the bottom are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. A yellow help box on the right contains text about help functionality. Three black lines with numbers 1, 2, and 3 point to the 'Operator' and 'Notes' fields, the 'Reaction Volume' and 'Sample Layout' fields, and the 'Next >>' button respectively.

**Figura 39. Campo "New Run Wizard" (Procedura guidata nuovo processo).** 1 = campi "Operator" (Operatore) e "Notes" (Annotazioni); 2 = campi "Reaction Volume" (Volume reazione) e "Sample Layout" (Configurazione campioni); 3 = "Next" (Avanti).

4. Lasciare i valori invariati nella finestra successiva. Non sono necessarie modifiche se il profilo di temperature è stato creato rispettando le istruzioni fornite nel protocollo: creazione di un profilo termico. Fare clic su Next (Avanti) (Figura 40).

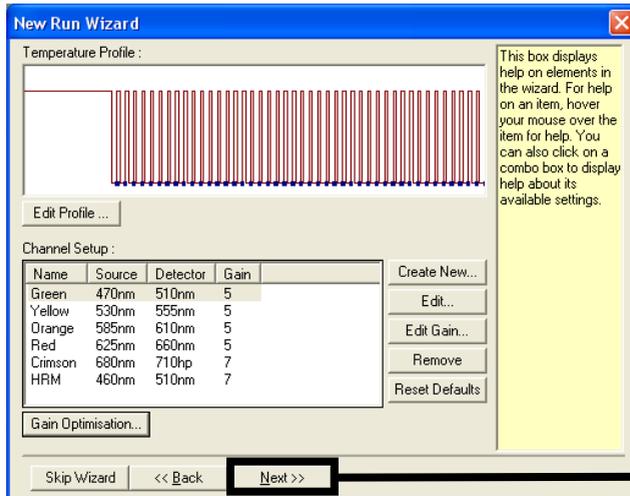


Figura 40. Campo "New Run Wizard" (Procedura guidata nuovo processo) e schermata di modifica delle temperature. 1 = "Next" (Avanti).

5. Controllare il riepilogo e fare clic su Start Run (Avvia seduta) per salvare il file della seduta e avviare la seduta (Figura 41).

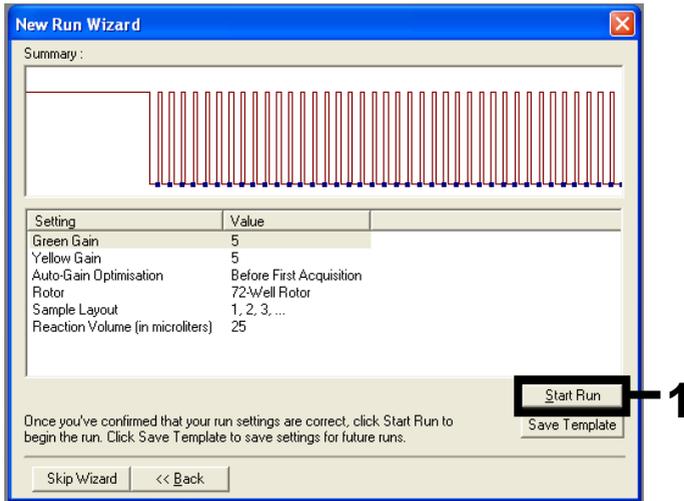


Figura 41. Campo "New Run Wizard" (Procedura guidata nuovo processo). 1 = "Start Run" (Avvia seduta).

**Nota:** dopo l'avvio della seduta viene visualizzata una nuova finestra, nella quale è possibile immettere subito i nomi dei campioni oppure, facendo clic su Finish (Fine), immettere i nomi in seguito, selezionando il pulsante Sample (Campione) durante o al termine della seduta.

Facendo clic su Finish and Lock Samples (Fine e blocca campioni) verrà impedita la modifica dei nomi dei campioni. L'utente deve prestare particolare attenzione durante l'inserimento dei nomi dei campioni per assicurare una corretta esecuzione dei test e delle analisi sui campioni.

**Nota:** quando vengono inseriti i nomi dei campioni, è opportuno lasciare bianchi i pozzetti vuoti nella colonna "Name" (Nome).

6. Al termine della seduta, analizzare i dati sulla base delle sezioni Analisi dei dati di valutazione dei campioni o Analisi del rilevamento delle mutazioni KRAS, come opportuno.
7. Se è necessario creare i report di quantificazione, fare clic sull'icona Reports nella barra degli strumenti del file della seduta Rotor-Gene Q.

---

## Appendice 2: installazione del software therascreen KRAS Assay Package

Il *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit è destinato all'uso con lo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dotato di un rotore a 72 pozzetti. Il *therascreen* KRAS Assay Package è disponibile separatamente su CD (n. cat. 9023675).

Per eseguire il download di *therascreen* KRAS Assay Package, visitare la pagina Web di prodotto di *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Le informazioni per il download sono disponibili nella sezione "Product Resources" (Risorse del prodotto), scheda "Supplementary Protocols" (Protocolli supplementari). È inoltre possibile ordinare i pacchetti di analisi su CD.

Il pacchetto include i modelli "*therascreen* KRAS CE QC Locked Template" (Modello bloccato QC KRAS *therascreen*) e "*therascreen* KRAS CE Locked Template" (Modello bloccato KRAS *therascreen*).

**Nota:** *therascreen* KRAS Assay Package funzionerà solo con il software Rotor-Gene Q versione 2.3 con *therascreen* KRAS Assay Package versione 3.0.3 (QIAGEN, n. cat. 9023675). Verificare di avere installato la versione corretta del software Rotor-Gene Q prima di procedere all'installazione del software *therascreen* KRAS Assay Package.

### Procedura (download)

1. Scaricare *therascreen* KRAS RGQ Assay Package dalla pagina Web di prodotto di *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Fare doppio clic sul file ed estrarre il file contenuto nell'archivio.
3. Fare doppio clic su `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe` per avviare l'installazione.

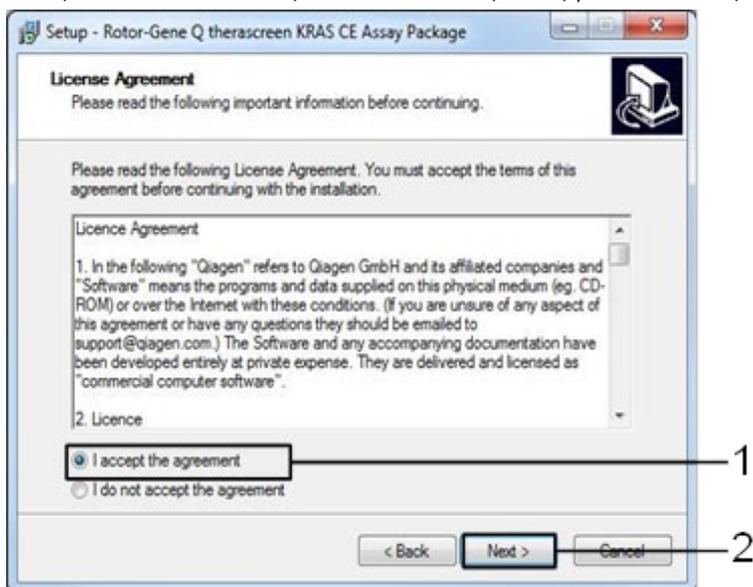
## Procedura (CD)

1. Ordinare il CD *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE compatibile con il software Rotor-Gene Q installato (vedere sopra), disponibile separatamente presso QIAGEN. Versione 3.0.3. N. cat. 9023675.
2. Inserire il CD nell'unità CD del portatile collegato allo strumento Rotor Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Fare doppio clic su *therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.0.3.exe* o *therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_1.0.12.exe* per avviare l'installazione. Viene visualizzata la procedura di installazione guidata.
4. Fare clic su Next (Avanti) per continuare (Figura 42).



Figura 42. Campo "Setup" (Configurazione). 1 = "Next" (Avanti).

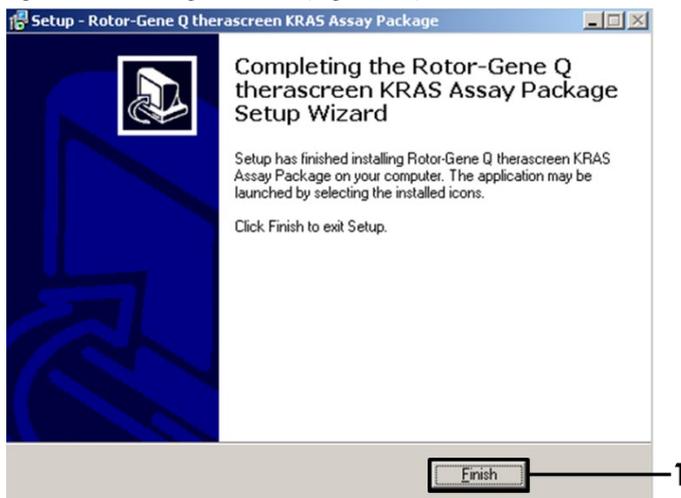
5. Leggere il contratto di licenza nella finestra di dialogo "License Agreement" (Contratto di licenza) e accettare i termini e le condizioni selezionando la casella "I accept the agreement" (Sottoscrivo il contratto). Fare clic su Next (Avanti) per continuare (Figura 43).



**Figura 43.** Finestra di dialogo "License Agreement" (Contratto di licenza). 1 = dichiarazione "I accept the agreement" (Sottoscrivo il contratto); 2 = "Next" (Avanti).

La configurazione del modello verrà avviata automaticamente.

6. Nella finestra finale Setup (Configurazione), fare clic su Finish (Fine) per chiudere la procedura guidata di configurazione. (Figura 44).



**Figura 44.** Completamento della procedura guidata.

7. Riavviare il computer. Vengono creati automaticamente sul desktop i collegamenti a "therascreen KRAS QC Locked Template" (Modello bloccato QC KRAS therascreen) e a "therascreen KRAS Locked Template" (Modello bloccato KRAS therascreen).

# Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Per 24 reazioni: 1 esame di controllo, 7 esami di mutazione, controllo positivo, acqua, <i>Taq</i> DNA polimerasi	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (versione 3.0.3)	Pacchetto di protocolli software da utilizzare con il <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit e lo strumento QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM con 72-Well Rotor	9023675
Rotor-Gene Q e accessori		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatile, software, accessori, 1- anno di garanzia su parti e materiali, installazione e addestramento non inclusi	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Termociclatore per real-time PCR e analizzatore per fusione ad alta risoluzione a 5 canali (verde, giallo, arancione, rosso, cremisi) più canale HRM, computer portatil, software, accessori, 1- anno di garanzia su parti e manodopera, installazione e addestramento	9002033
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

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>N. cat.</b>
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strisce di 4 provette e tappi per 1000 reazioni	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strisce di 4 provette e tappi per 10.000 reazioni	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — per la purificazione del DNA genomico da tessuti inclusi in paraffina		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: colonne QIAamp MinElute®, proteinasi K, tamponi e Collection Tubes (2 ml)	56404

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit o il manuale dell'utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

# Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R4, gennaio 2019	Aggiunto Rappresentante autorizzato (prima di copertina) Sezione Simboli aggiornata Modello aggiornato
R5, novembre 2019	Modifica del produttore legale (copertina) Rimozione del simbolo EC + REP dalla copertina e dalla sezione Simboli Adattamento del nome dello strumento da Rotor-Gene Q MDx a Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM per allinearlo al nome sull'etichetta dello strumento Aggiornamento del protocollo Rilevazione delle mutazioni KRAS per includere un altro passaggio nella preparazione delle miscele master Correzione dei valori nelle colonne Frequency (Frequenza) e 95% Confidence Interval (Intervallo di confidenza del 95%) nella Tabella 10. Aggiornamento della concordanza percentuale complessiva CRC da 96,4% a 96,82% Correzione dei valori nella colonna LoD C <sub>95</sub> nella Tabella 15
R6, novembre 2020	Correzione della versione del theascreen KRAS Assay Package alla 3.0.3 Aggiornamento di tutto il documento per quanto riguarda la disponibilità al download del pacchetto di esame all'indirizzo <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> Aggiunta di una nota in tutto il documento riguardante le azioni relative all'aggiornamento degli errori per l'indicazione NSCLC per garantire il corretto funzionamento del kit Aggiunta di una nota in tutte le procedure di questo documento sulla corretta miscelazione dei reagenti Aggiornamento della sezione Precauzioni generali Aggiunta di una nota per il corretto posizionamento dello strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Aggiunta di una nota relativa all'uso di scalpellini asciutti Aggiornamento del Protocollo: Valutazione del campione di DNA per aggiungere ulteriori punti importanti prima di iniziare Aggiornamento della sezione Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS per aggiungere ulteriori punti importanti prima di iniziare e una nota in merito ai campioni NSCLC per interpretare diversi errori come "Invalid" (Non valido) Aggiornamento della sezione relativa agli errori del Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package per aggiungere tabelle che illustrano gli errori RGQ, il loro significato e le azioni consigliate Aggiornamento dell'Interpretazione dei risultati per quanto riguarda le azioni relative agli errori. Aggiornamento della sezione Guida alla risoluzione dei problemi per aggiungere tabelle che illustrano gli errori RGQ, il loro significato e le azioni consigliate Aggiornamento della sezione Limitazioni per aggiungere informazioni sui campioni NSCLC

Data	Modifiche
	<p>Revisione della sezione Caratteristiche delle prestazioni per aggiornare i dati nelle tabelle</p> <p>Aggiornamento della sezione DNA iniziale e linearità</p> <p>Aggiornamento della sezione Ripetibilità e riproducibilità</p> <p>Aggiornamento della sezione Variabilità nella gestione dei campioni</p> <p>Prestazioni cliniche Aggiunta della sezione</p> <p>Aggiornamento della sezione Analisi dei dati relativi alla valutazione dei campioni per rivedere la soluzione raccomandata per il valore <math>C_T &gt; 32</math> dell'esame di controllo del campione</p> <p>Marchio per la Conformità Europea aggiunto alla sezione Simboli</p> <p>Aggiornamento della sezione Interpretazione dei risultati (manuale) per quanto riguarda le azioni relative agli errori.</p> <p>Aggiornamento della sezione Protocollo: rilevazione delle mutazioni KRAS per includere i passaggi per la preparazione delle miscele master</p>

---

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

#### Accordo di licenza limitata del *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede nessuna 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, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://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, consultare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marchi commerciali: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, MinElute<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Scorpions<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ARMS<sup>®</sup> (AstraZeneca Ltd.); LUMYKRAS<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, 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.

*Non per uso con campioni di feci.*

*Non per uso con campioni di urina.*

*Non per uso con acido nucleico extra-cellulare da un campione di sangue.*

*Non per uso con campioni di midollo osseo privi di cellule.*

*Non per uso con campioni di saliva.*

ACQUISTANDO QUESTO PRODOTTO SI ACQUISISCONO I DIRITTI, NELL'AMBITO DI DETERMINATI BREVETTI ROCHE, ALL'USO DEL PRODOTTO ESCLUSIVAMENTE AI FINI DELLA FORNITURA DI SERVIZI DI DIAGNOSTICA UMANA IN VITRO. NON SI ACQUISISCE TUTTAVIA NESSUN'ALTRA LICENZA DI NESSUN TIPO, AD ECCEZIONE DEL SUDDETTO DIRITTO SPECIFICO ALL'USO DERIVANTE DALL'ACQUISTO.

1127513 HB-1861-006 04-2022 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

