

Guide d'utilisation du logiciel PyroMark[®] Q24 MDx

Version 1

Pour utilisation sur le système PyroMark Q24 MDx

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*



9019063



1063400FR



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1063400FR



QIAGEN® Sample and Assay Technologies

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillons et d'analyses, permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services ultramodernes de grande qualité garantissent un succès total, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines ;
- analyses d'acides nucléiques et de protéines ;
- recherche micro-ARN et interférence ARN ;
- automatisation des technologies d'échantillons et d'analyses.

Notre mission est de permettre à notre clientèle de réussir et d'accomplir des progrès décisifs. Pour plus d'informations, visiter www.qiagen.com.

Sommaire

Symboles	5
Utilisation prévue	5
Limitations de l'utilisation du produit	5
Garantie des produits et garantie de satisfaction	6
Support technique	6
Introduction	8
À propos de ce guide d'utilisation	8
Logiciel PyroMark Q24 MDx	9
Modes d'analyse	9
Navigateur des raccourcis	10
Menus et barres d'outils principaux	12
Histogramme	16
Pyrogramme	17
Sélection de puits	19
Démarrage du logiciel	20
Configuration d'une analyse AQ ou CpG	20
Enchaînement des étapes	20
Saisie de la séquence à analyser	21
Définition de l'ordre de distribution	24
Ajout ou suppression de témoins de traitement par le bisulfite (analyses CpG)	26
Configuration des positions variables	26
Modification des paramètres d'analyse	28
Configuration d'une analyse SQA	34
Enchaînement des étapes	34
Saisie de l'ordre de distribution	35
Modification des paramètres d'analyse	35
Configuration d'un run	37
Enchaînement des étapes	37
Saisie des paramètres du run	38
Ajout de fichiers d'analyse pour une plaque	39
Saisie des ID d'échantillons et des notes	40

Copie ou suppression du contenu des cellules	40
Impression et exportation de la configuration d'une plaque sous forme d'image	42
Définition d'un ID d'échantillon et d'une note en dehors du logiciel	42
Révision de la configuration d'une plaque	44
Traitement d'un run sur l'appareil PyroMark Q24 MDx	45
Enchaînement des étapes	45
Analyse du run	46
Enchaînement des étapes	46
Analyse de tous les puits ou d'une sélection de puits	46
Affichage des résultats d'analyse	47
Modification des paramètres d'analyse	51
Modification des évaluations de la qualité	53
Modification des séquences d'appel de bases	54
Affichage, impression et enregistrement des rapports d'analyse	55
Rapport « Analysis Statistics » (Statistiques d'analyse)	56
Rapport « Analysis Results » (Résultats d'analyse)	57
Rapport « Pyrogram report » (Rapport du pyrogramme)	59
Rapport « Full report » (Rapport complet)	61
Rapport « SNP Overview Report » (Rapport d'ensemble des SNP)	62
Gestion des méthodes de l'appareil	63
Paramètres de la méthode	64
Trucs et astuces	65
Validation des analyses	65
Journal d'analyse	65
Protection des fichiers	65
Protection des résultats d'analyse	66
Résolution des principaux problèmes rencontrés	67
Annexe A : Messages du logiciel PyroMark Q24 MDx	68
Références	79

Symboles



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Marque CE, conformément à la Directive européenne sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (IVD) 98/79/CE



Référence



Numéro du matériel



Fabricant légal



Se reporter au manuel



Remarque importante

Utilisation prévue

Le logiciel PyroMark Q24 MDx est l'application associée au pyroséquenceur PyroMark Q24 MDx servant à la détection des modifications des positions variables spécifiées de la séquence d'ADN qui peuvent avoir une signification clinique.

Le PyroMark Q24 MDx est destiné au diagnostic *in vitro* en Europe.

Limitations de l'utilisation du produit

Le logiciel PyroMark Q24 MDx est destiné à des utilisateurs professionnels, tels que les techniciens et les médecins formés au fonctionnement du système du même nom et aux techniques de la biologie moléculaire.

Toutes les opérations doivent être réalisées conformément à ce manuel, aux messages qui s'affichent sur l'écran du PyroMark Q24 MDx tels qu'indiqués dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx, aux indications des manuels des kits QIAGEN compatibles avec le système, au support technique de QIAGEN et dans les limites définies par les spécifications techniques.

Le matériel nécessaire à la préparation des échantillons pour l'analyse par pyroséquençage n'est pas inclus.

Le produit est exclusivement destiné à une utilisation sur le pyroséquenceur PyroMark Q24 MDx.

Pour des résultats optimaux, il est impératif de respecter scrupuleusement les indications du manuel d'utilisation de l'appareil et du présent guide. La dilution des réactifs autre que celle décrite dans le présent manuel n'est pas recommandée et entraîne une perte de performances.

Prêter attention aux dates limites d'utilisation et aux conditions de stockage imprimées sur l'emballage et les étiquettes des composants. Ne pas utiliser de composants périmés ou stockés dans de mauvaises conditions.

Les résultats fournis par le système PyroMark Q24 MDx doivent impérativement être interprétés dans le contexte des observations cliniques et des résultats d'analyse de laboratoire pertinents.

Garantie des produits et garantie de satisfaction

QIAGEN garantit la performance de tous ses produits de la manière décrite dans sa documentation. L'acheteur doit déterminer la pertinence du produit pour son usage particulier. Si un produit n'offre pas une performance satisfaisante pour toute autre raison qu'un mauvais usage, QIAGEN le remplacera gratuitement ou remboursera le prix d'achat. Nous nous réservons le droit de changer, altérer ou modifier un produit pour améliorer sa performance et son esthétique. Si un produit QIAGEN ne répond pas aux attentes, appeler le Service technique ou le distributeur local. Nous proposons au choix le remboursement ou l'échange du produit. Des conditions distinctes s'appliquent aux instruments scientifiques, produits de services et produits expédiés sur glace sèche de QIAGEN. Se renseigner pour en savoir plus.

Une copie des conditions générales de QIAGEN peut être obtenue sur demande et figure également au dos de nos factures. Pour toute question sur les spécifications ou la performance des produits, appeler les Services techniques de QIAGEN ou le distributeur local (voir quatrième de couverture ou www.qiagen.com).

Support technique

Chez QIAGEN, nous sommes fiers de la qualité et de la disponibilité de notre support technique. Nos services techniques sont composés de scientifiques expérimentés bénéficiant d'un vaste savoir-faire pratique et théorique en ce qui concerne les technologies d'échantillons et d'analyses et l'utilisation des produits QIAGEN. Pour toute question ou en cas de difficultés concernant le PyroMark Q24 MDx ou les produits QIAGEN en général, nous contacter.

Les clients de QIAGEN constituent une source d'informations majeure relative aux utilisations avancées ou spécialisées de nos produits. Ces informations sont utiles à d'autres scientifiques ainsi qu'aux chercheurs de chez QIAGEN. Par conséquent, ne pas hésiter à nous contacter pour toute suggestion concernant la performance des produits ou de nouvelles applications et techniques.

Pour le support technique et plus d'informations, consulter notre Centre de support technique à l'adresse www.qiagen.com/Support ou appeler l'un des Services techniques de QIAGEN ou des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Introduction

À propos de ce guide d'utilisation

Le présent guide d'utilisation renseigne sur les fonctions et les caractéristiques du logiciel PyroMark Q24 MDx. Pour des informations complètes sur l'entretien, la maintenance et l'utilisation du séquenceur et du poste de travail sous vide, consulter le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Le présent guide d'utilisation décrit les caractéristiques du logiciel et des outils associés pour permettre à l'utilisateur de gérer et modifier les fichiers et les analyses.

Le manuel est composé des sections suivantes :

- Introduction
- Logiciel PyroMark Q24 MDx
- Démarrage du logiciel
- Configuration d'une analyse AQ ou CpG
- Configuration d'une analyse SQA
- Configuration d'un run
- Traitement d'un run sur l'appareil PyroMark Q24 MDx
- Analyse du run
- Affichage, impression et enregistrement des rapports d'analyse
- Gestion des méthodes de l'appareil
- Trucs et astuces
- Résolution des principaux problèmes rencontrés

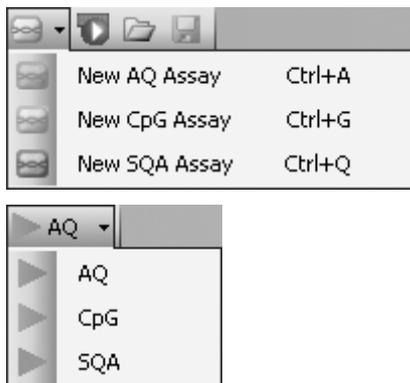
Logiciel PyroMark Q24 MDx

Le système PyroMark Q24 MDx est une solution complète comprenant un appareil, un poste de travail sous vide, des réactifs et un logiciel.

Il présente les avantages suivants :

- Quantification haute résolution des mutations bi-, tri- ou tétra-alléliques
- Génotypage et quantification des InDels
- Dans les analyses AQ et CpG, utilisation du contexte de la séquence comme témoin de qualité intégré
- Analyse de la méthylation en présence de polymorphismes mononucléotidiques (SNP)
- Dans les analyses de méthylation, témoin de qualité intégré du traitement par le bisulfite
- Détermination de la séquence par appel de bases avec évaluation de la qualité

Modes d'analyse



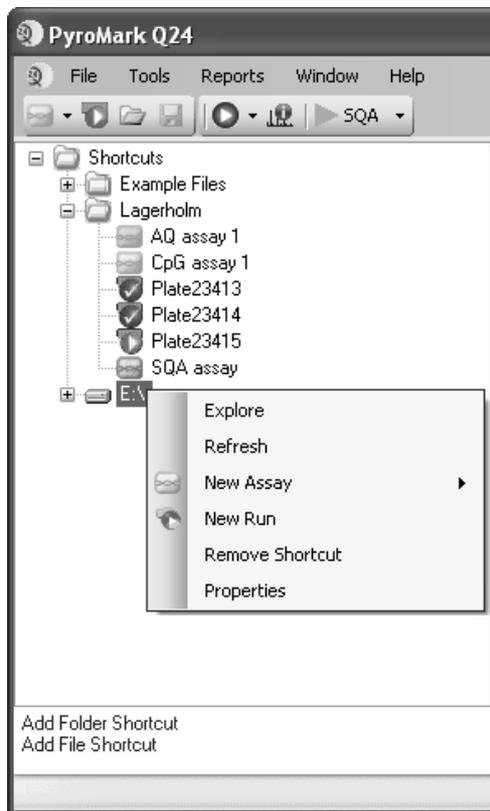
Trois modes d'analyse sont proposés sur le logiciel PyroMark Q24 MDx :

- AQ : Différentes études de quantification et d'analyse du génotype des SNP et des InDels
- CpG : Analyse de la méthylation de plusieurs sites de dinucléotides CpG consécutifs
- SQA : Détermination de séquences inconnues par appel de bases

Les trois types d'analyses peuvent être réalisés sur la même plaque PyroMark Q24. Pour passer d'un mode d'analyse à un autre, sélectionner « AQ », « CpG » ou « SQA » dans la barre d'outils de l'écran d'analyse.

Navigateur des raccourcis

Le navigateur des raccourcis offre un moyen simple et rapide d'accéder au contenu des dossiers ainsi qu'aux fichiers d'analyse et de run les plus utilisés.



Les icônes suivantes sont utilisées pour renseigner sur les fichiers :

-  Fichier d'analyse AQ
-  Fichier d'analyse CpG
-  Fichier d'analyse SQA
-  Fichier de run non traité
-  Fichier de run traité
-  Raccourci erroné. Causes possibles : serveur réseau momentanément indisponible ou fichier ou dossier déplacés, renommés ou supprimés en dehors du logiciel

Ajout et suppression de raccourcis, mise à jour du contenu d'un dossier et affichage des propriétés d'un fichier et d'un dossier :

- Pour ajouter un raccourci vers un dossier ou un lecteur, cliquer sur « Add Folder Shortcut » (Ajouter un raccourci vers un dossier) ou cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier « Shortcuts » (Raccourcis) puis sélectionner « Add Folder Shortcut » dans le menu contextuel.
- Pour ajouter un raccourci vers un fichier, cliquer sur « Add File Shortcut » (Ajouter un raccourci vers un fichier) ou cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier « Shortcuts » puis sélectionner « Add File Shortcut » dans le menu contextuel.
- Pour supprimer un raccourci, cliquer dessus avec le bouton droit de la souris puis sélectionner « Remove Shortcut » (Supprimer le raccourci) dans le menu contextuel. (Il est impossible de supprimer séparément les fichiers et les sous-dossiers d'un dossier de raccourcis.)
- Pour mettre à jour le contenu d'un dossier, cliquer avec le bouton droit de la souris sur ce dossier puis sélectionner « Refresh » (Actualiser) dans le menu contextuel.

- Pour afficher les propriétés d'un fichier ou d'un dossier, par exemple pour voir les paramètres d'un run, cliquer avec le bouton droit de la souris sur ce fichier ou ce dossier puis sélectionner « Properties » (Propriétés) dans le menu contextuel.

Remarque : Lorsque le pointeur de la souris est placé sur un fichier dans le navigateur des raccourcis, une infobulle affiche la note de l'analyse dans le cas des fichiers d'analyse ou l'ID de plaque dans le cas des fichiers de run (si ces informations ont été saisies).

Création, ouverture et copie des fichiers, affichage du journal d'un run traité :

- Pour créer un nouveau fichier d'analyse, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier souhaité puis sélectionner « New Assay » (Nouvelle analyse) et le type d'analyse dans le menu contextuel. Saisir le nom du fichier puis appuyer sur « Enter » (Entrée). Pour configurer l'analyse, voir page 20 (AQ ou CpG) ou page 34 (SQA).
- Pour créer un nouveau fichier de run, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier souhaité puis sélectionner « New Run » (Nouveau run) dans le menu contextuel. Saisir le nom du fichier puis appuyer sur « Enter ». Pour configurer un run, voir page 37.

Pour copier le fichier d'un run traité et répéter le run, cliquer avec le bouton droit de la souris sur ce fichier puis sélectionner « Copy and Rerun » (Copier et répéter le run) dans le menu contextuel.

Remarque : Seules les données de configuration du run sont copiées, pas les données du run ni de son analyse.

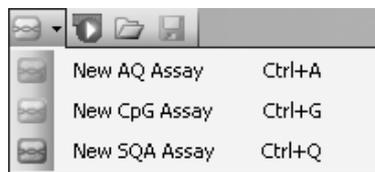
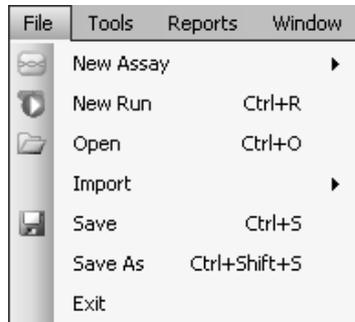
- Pour copier un fichier, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier contenant ce fichier puis sélectionner « Explore » (Parcourir) dans le menu contextuel. Windows® Explorer (Explorateur Windows) s'ouvre. Pour plus d'informations, appuyer sur la touche « F1 » afin d'ouvrir l'aide en ligne de Windows Explorer (Explorateur Windows).

Remarque : Afin d'éviter la perte de données, ne pas copier de fichier ouvert dans le logiciel PyroMark Q24 MDx.

- Pour ouvrir un fichier, double-cliquer dessus ou cliquer dessus avec le bouton droit de la souris puis sélectionner « Open » (Ouvrir) dans le menu contextuel. Pour ouvrir le fichier d'un run traité, sélectionner « Open with » (Ouvrir avec) suivi du mode d'analyse (« AQ », « CpG » ou « SQA »).
- Pour afficher les paramètres et le journal de run pour un fichier de run traité, cliquer avec le bouton droit de la souris sur ce fichier puis sélectionner « Run Information » (Informations sur le run) dans le menu contextuel.

Menus et barres d'outils principaux

Menu et barre d'outils File (Fichier)



Pour créer un nouveau fichier d'analyse, sélectionner « New Assay » ou cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner le type d'analyse à créer dans le menu contextuel. Pour configurer l'analyse, voir page 20 (AQ ou CpG) ou page 34 (SQA).

Pour créer un nouveau fichier de run, sélectionner « New Run » ou cliquer sur le bouton vert  dans la barre d'outils. Pour configurer un run, voir page 37.

Pour ouvrir un fichier d'analyse ou de run enregistré, sélectionner « Open » ou cliquer sur  dans la barre d'outils.

Pour créer un nouveau run à partir de l'agencement d'une plaque sur lequel figure les ID d'échantillons et les notes (facultatives) défini dans un fichier texte délimité par des tabulations ou des virgules (*.tsv, *.txt ou *.csv), sélectionner « Create New Run from Sample Layout File » (Créer un nouveau run à partir d'un fichier d'agencement d'échantillons) dans le sous-menu « Import » (Importer). Voir page 42.

Pour créer une nouvelle analyse AQ ou CpG à partir d'un fichier d'analyse (*.xml) créé dans le logiciel PyroMark Assay Design, sélectionner « Create New AQ/CpG Assay from Assay Design File » (Créer une nouvelle analyse AQ/CpG à partir d'un fichier Assay Design) dans le sous-menu « Import ». Le logiciel importe la séquence à analyser et les noms des positions variables.

Pour enregistrer les modifications apportées au fichier actif, sélectionner « Save » (Enregistrer) ou cliquer sur  dans la barre d'outils. Si le fichier n'a encore jamais été enregistré, sélectionner un emplacement et saisir le nom de fichier dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.

Pour enregistrer une copie du fichier actif, sélectionner « Save As » (Enregistrer sous). Sélectionner un emplacement et saisir le nom de fichier dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.

Pour fermer le logiciel, sélectionner « Exit » (Quitter).

Menu Tools (Outils) pour les fichiers de runs non traités

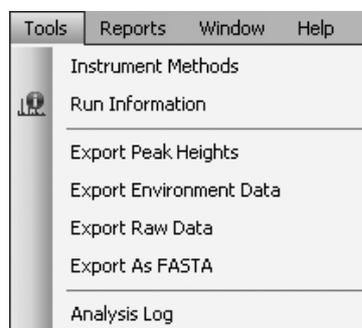


Pour afficher les paramètres des méthodes de l'appareil et, si nécessaire, importer ou configurer de nouvelles méthodes en fonction des paramètres fournis par QIAGEN, sélectionner « Instrument Methods » (Méthodes de l'appareil). (Voir Gestion des méthodes de l'appareil, page 63).

Pour afficher la configuration de la plaque et une liste des volumes requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides pour le fichier actif, sélectionner « Pre Run Information » (Informations avant le run). Pour imprimer le rapport, cliquer sur .

Remarque : Pour imprimer le rapport « Pre-Run Information » en couleur, activer l'option « Print background colors and images » (Imprimer les couleurs et les images d'arrière-plan) d'Internet Explorer dans « Tools/Internet Options/Advanced/Printing » (Outils/Options Internet/Avancés/Impression en cours).

Menu Tools pour les fichiers de runs traités



Pour afficher les paramètres et le journal de run pour le fichier de run actif, sélectionner « Run Information ». Pour imprimer le rapport, cliquer sur .

Pour enregistrer la hauteur des pics de tous les puits utilisés dans un fichier texte, sélectionner « Export Peak Heights » (Exporter hauteur des pics).

Pour enregistrer la vitesse d'agitation, la température de l'unité de chauffage et la pression dans un fichier texte, sélectionner « Export Environment Data » (Exporter les données ambiantes). La température ambiante, celle du couvercle de la chambre de traitement et du réfrigérant sont également indiquées.

Pour enregistrer les intensités et les données de distribution dans un fichier texte, sélectionner « Export raw Data » (Exporter les données brutes).

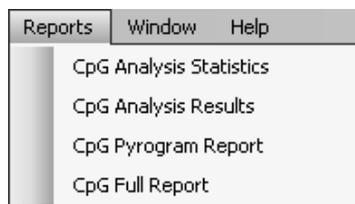
Pour enregistrer les séquences d'appel de bases au format FASTA (analyses SQA uniquement), sélectionner « Export As FASTA » (Exporter sous FASTA). Dans la boîte de dialogue qui s'ouvre, sélectionner les puits à inclure (tous ou une sélection),

l'ordre de tri des puits (ligne ou colonne) et les bases des séquences à inclure (toutes, succès, succès + à vérifier ou seulement une plage de contrôle qualité).

Pour afficher ou enregistrer le journal de toutes les analyses réalisées dans le puits sélectionné sous forme de fichier HTML, sélectionner « Analysis Log » (Journal d'analyse). Chaque analyse est consignée avec ses paramètres, son mode (AQ, CpG ou SQA), sa version, les résultats (avertissements compris), la date et l'heure et le compte d'utilisateur Windows utilisé pour réaliser l'analyse (voir Trucs et astuces, page 65).

Il est possible d'importer les fichiers texte (*.tsv ou *.csv) dans Microsoft® Excel® ou une autre application capable de prendre en charge les données séparées par des points-virgules (;) ou des tabulations. Ceci est utile à la réalisation de calculs supplémentaires sur les données.

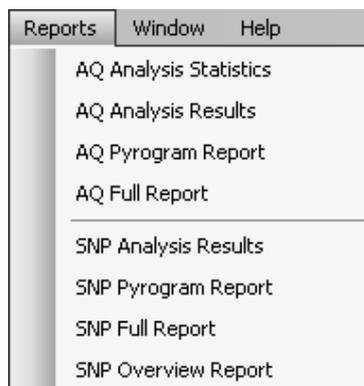
Menu Reports
(Rapports) pour les
runs CpG



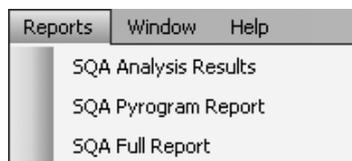
Le rapport « Analysis Statistics » fournit les statistiques d'analyse de tous les puits ou d'une sélection de puits.

Il fournit des informations sur les puits et les résultats d'analyse de ceux-ci.

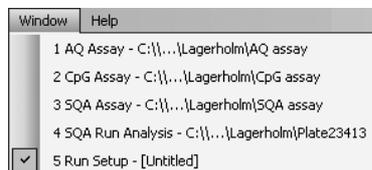
Menu Reports pour les runs AQ



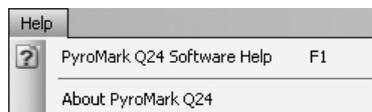
Menu Reports pour les runs SQA



Menu Window (Fenêtre)



Menu Help (Aide)



Le rapport « Pyrogram Report » fournit des informations et le Pyrogram[®] (ou pyrogramme) de tous les puits ou d'une sélection de puits.

Le rapport « Full Report » comprend les paramètres et le journal du run, les informations sur les puits et les résultats d'analyse (pyrogramme compris) pour tous les puits ou une sélection de puits.

Le rapport « SNP Overview Report » comprend les génotypes et les évaluations de la qualité de tous les SNP et des InDels. Les informations sont présentées sous forme de vues d'ensemble des plaques avec une plaque par numéro de position.

Les options de rapport sont disponibles uniquement pour les runs traités. Pour plus d'informations sur les rapports, voir page 55.

Remarque : Un lecteur de document PDF doit être installé sur l'ordinateur pour pouvoir lire les rapports au format PDF. Il est possible de télécharger Adobe[®] Reader[®] à partir du site www.adobe.com.

Ce menu permet de basculer dans le logiciel d'un fichier ouvert à un autre.

Pour ouvrir le présent guide d'utilisation, sélectionner « PyroMark Q24 Software Help » (Aide du logiciel PyroMark Q24) ou appuyer sur la touche « F1 ».

Barre d'outils d'analyse

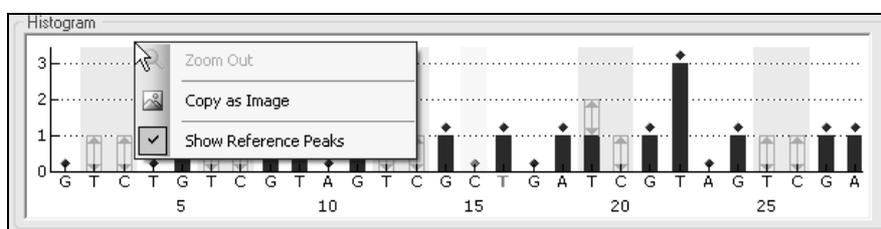


Cliquer sur  et sélectionner « Analyze All Wells » (Analyser tous les puits) ou « Analyze Selected Wells » (Analyser sélection de puits) pour le fichier de run actif. Voir Sélection de puits, page 19.

Pour afficher les paramètres et le journal de run du fichier de run actif, cliquer sur . Pour imprimer le rapport, cliquer sur .

Pour basculer entre les différents modes d'analyse, sélectionner « AQ », « CpG » ou « SQA » dans la barre d'outils.

Histogramme



Histogramme représentant un résultat théorique d'analyse CpG

Lors de la configuration d'une analyse AQ ou CpG, la représentation théorique des pics de Pyrosequencing® (ou pyroséquençage) attendus est affichée dans la zone « Histogram » (Histogramme). L'histogramme utilise les icônes et couleurs suivantes :

- Les positions variables sont mises en évidence par une couleur de fond bleu-gris.
- Lors de l'affichage des pics de référence, ceux-ci sont identifiés par des losanges bleus.
- Les témoins du traitement par le bisulfite sont mis en évidence par une couleur de fond jaune. Lors de l'affichage des pics de référence, les témoins du traitement par le bisulfite sont identifiés par des losanges orange (analyses CpG uniquement).

Zoom de l'histogramme

Il est possible d'effectuer un zoom avant sur l'histogramme en sélectionnant une section à l'aide du bouton gauche de la souris.

Pour effectuer un zoom arrière, cliquer avec le bouton droit de la souris sur l'histogramme et sélectionner « Zoom out » (Zoom arrière) dans le menu contextuel pour revenir au niveau de zoom précédent ou double-cliquer sur l'histogramme pour le réinitialiser sur 100 %.

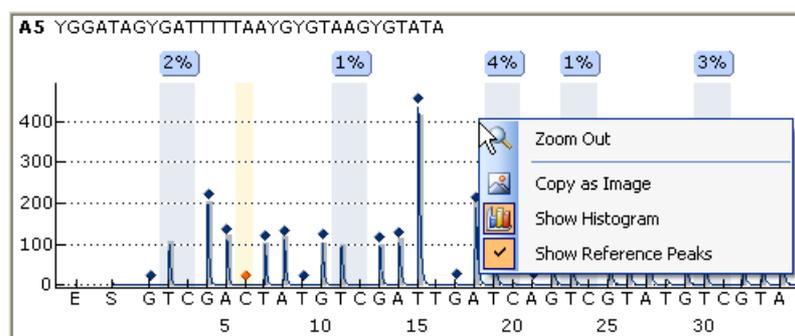
Exportation de l'histogramme sous forme d'image

Pour copier l'histogramme dans le presse-papier sous forme d'image, cliquer avec le bouton droit de la souris sur l'histogramme et sélectionner « Copy as Image » (Copier sous forme d'image) dans le menu contextuel. Il est possible de coller l'image dans des applications qui prennent en charge le format EMF (Enhanced Metafile).

Pyrogramme

Il s'agit du graphique résultant de la réaction de pyroséquençage. Les nucléotides intégrés sont représentés sous forme de pics sur le pyrogramme.

Analyses AQ et CpG



Le pyrogramme des analyses AQ et CpG utilise les informations, les icônes et les couleurs suivantes :

- Le nom du puits et la séquence à analyser figurent dans le coin supérieur gauche.
- Le résultat d'analyse (fréquence des allèles ou pourcentage de méthylation) est affiché au-dessus de chaque position variable, par exemple --: 56% (InDel) et 96%. La couleur de fond reflète l'évaluation de la qualité du résultat d'analyse. Voir la légende des couleurs page 49. En cas de modification d'une évaluation de la qualité par l'utilisateur, cette information est représentée par un cadre entourant le résultat d'analyse, par exemple 44%. Si le pointeur de la souris est placé sur un résultat d'analyse, une infobulle affiche le numéro de la position et les avertissements de l'analyse.

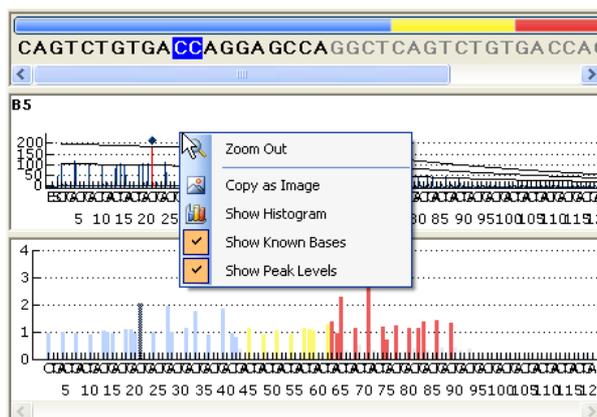
Remarque : (en blanc) = désélectionné par l'utilisateur. N/A (en blanc) = analyse non prise en charge par le logiciel, cas par exemple d'une analyse SNP en mode CpG. N/A (en rouge) = analyse impossible en raison du manque de données.

- Les positions variables sont mises en évidence par une couleur de fond bleu-gris.

- Lors de l'affichage des pics de référence, ceux-ci sont identifiés par des losanges bleus.
- Les témoins du traitement par le bisulfite sont mis en évidence par une couleur de fond jaune pâle. Lors de l'affichage des pics de référence, les témoins du traitement par le bisulfite sont identifiés par des losanges orange (analyses CpG uniquement).
- Pour afficher la hauteur d'un pic, placer le pointeur de la souris en haut du pic. Une infobulle affiche la hauteur.
- Lors de l'affichage de l'histogramme, celui-ci apparaît en gris par dessus les pics. Il est préférable de l'observer en zoomant.

Remarque : Il est possible de basculer entre l'affichage et le masquage de l'histogramme et des pics de référence en cliquant avec le bouton droit de la souris sur le pyrogramme.

Analyses SQA



Lors de la sélection d'une base de la séquence d'appel de bases, le pic correspondant est mis en surbrillance dans les deux zones du pyrogramme et vice versa.

Le pyrogramme des analyses SQA utilise les informations et les couleurs suivantes :

- Le nom du puits figure dans le coin supérieur gauche.
- Pour afficher la hauteur d'un pic, placer le pointeur de la souris en haut du pic. Une infobulle affiche la hauteur.
- Lors de l'affichage de l'histogramme, le pyrogramme compensé apparaît en gris par dessus les pics du pyrogramme. Il est préférable de l'observer en zoomant.
- Lors de l'affichage des bases connues, les pics correspondants sont identifiés par des losanges bleus sur le pyrogramme.
- Lors de l'affichage du niveau de pic, le niveau de pic calculé apparaît sur le pyrogramme.

- Sur le pyrogramme compensé, dans la partie inférieure, les pics sont colorés en fonction des évaluations de la qualité (voir la légende des couleurs, page 49.)

Remarque : Il est possible de basculer entre l’affichage et le masquage de l’histogramme, des bases connues et du niveau de pic en cliquant avec le bouton droit de la souris sur le pyrogramme.

Zoom du pyrogramme

Il est possible d’effectuer un zoom avant sur le pyrogramme en sélectionnant une section à l’aide du bouton gauche de la souris.

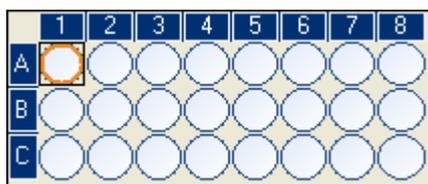
Pour effectuer un zoom arrière, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le pyrogramme et sélectionner « Zoom out » dans le menu contextuel pour revenir au niveau de zoom précédent ou double-cliquer sur le pyrogramme pour le réinitialiser sur 100 %.

Exportation du pyrogramme sous forme d’image

Pour copier le pyrogramme dans le presse-papier sous forme d’image, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le pyrogramme et sélectionner « Copy as Image » dans le menu contextuel. Il est possible de coller l’image dans des applications qui prennent en charge le format EMF (Enhanced Metafile).

Sélection de puits

Pour sélectionner un seul puits, cliquer dessus.



Pour sélectionner un groupe de puits de forme rectangulaire, par exemple A2-A3, B2-B3 et C2-C3 :

- Appuyer sur le bouton gauche de la souris et le maintenir enfoncé tout en faisant glisser le pointeur de la souris du puits A2 au puits C3 ou
- Sélectionner le puits A2 puis appuyer sur la touche « Shift » (« majuscule ») et la maintenir enfoncée tout en sélectionnant le puits C3 ou
- Sélectionner le puits A2 puis appuyer sur la touche « Shift » (« majuscule ») et la maintenir enfoncée tout en appuyant sur la touche fléchée vers la droite une fois puis sur la touche fléchée vers le bas deux fois.



Pour ajouter des puits à la sélection ci-dessus, par exemple les puits B7 et C7, appuyer sur la touche « Ctrl » et la maintenir enfoncée tout en sélectionnant les puits.



Pour désélectionner un puits, appuyer sur la touche « Ctrl » et la maintenir enfoncée tout en sélectionnant le puits.

Remarque : Lorsque plusieurs puits d'une plaque sont sélectionnés, ce sont les informations sur le puits encadré en orange (dans l'écran d'analyse) qui sont affichées dans la zone « Well Information » (Informations sur le puits).

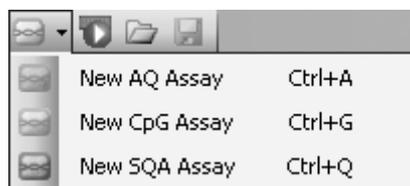
Démarrage du logiciel

Dans le menu « Start » (Démarrer) de Windows, sélectionner « (All) Programs/PyroMark/PyroMark Q24 » (Tous les programmes/PyroMark/PyroMark Q24).

Il est possible d'accéder à tout moment au *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx* (le présent document) en appuyant sur la touche « F1 » dans le logiciel.

Configuration d'une analyse AQ ou CpG

Enchaînement des étapes



1. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sélectionner « New AQ Assay » (Nouvelle analyse AQ) ou « New CpG Assay » (Nouvelle analyse CpG). Un nouveau fichier d'analyse est créé.
2. Saisir la séquence à analyser (voir page 21).

3. Cliquer sur le bouton « Generate Dispensation Order » (Définir l'ordre de distribution). Voir page 24.
4. **Facultatif** : Lors de la création d'une analyse CpG, renseigner le champ « Sequence Before Bisulfite Treatment » (Séquence avant traitement par le bisulfite). Cette information est utile en cas d'ajout de témoins du traitement par le bisulfite.
5. **Recommandation** : Lors de la création d'une analyse CpG, ajouter des témoins de traitement par le bisulfite, de préférence en début de séquence (voir page 26).
6. **Facultatif** : Saisir des informations sur l'analyse dans la zone de texte « Assay Note » (Note sur l'analyse).
7. **Facultatif** : Configurer les positions variables (voir page 26).
8. **Avant d'analyser les échantillons, valider l'analyse à l'aide d'un échantillon d'ADN de référence, voir l'Annexe B du Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx.**
9. **Facultatif** : Si cela s'avère nécessaire au cours de la validation de l'analyse, modifier les paramètres d'analyse. Voir page 28.
10. **Facultatif** : Verrouiller l'analyse pour en empêcher la modification à l'aide du bouton « Lock Assay » (Verrouiller l'analyse) situé en bas de la fenêtre de configuration de l'analyse. Il est impossible de déverrouiller une analyse verrouillée (🔒) réalisée sur l'appareil PyroMark Q24 MDx. C'est-à-dire qu'il est impossible d'en modifier les paramètres ou les résultats une fois l'analyse effectuée.

Remarque : Il est possible de créer un nouveau fichier d'analyse dans le navigateur des raccourcis en cliquant avec le bouton droit de la souris sur le dossier dans lequel enregistrer le fichier de l'analyse puis en sélectionnant « New Assay » suivi du type d'analyse souhaité (choix entre « AQ Assay » (Analyse AQ) et « CpG Assay » (Analyse CpG)) dans le menu contextuel. Saisir le nom du fichier puis appuyer sur « Enter ». Pour ajouter un raccourci vers un dossier ou un lecteur, cliquer sur « Add Folder Shortcut ».

Remarque : Pour afficher la note sur l'analyse dans une infobulle du navigateur de raccourcis, placer le pointeur de la souris sur le fichier d'analyse.

Remarque : Pour enregistrer le fichier, cliquer sur  dans la barre d'outils. Si le fichier n'a encore jamais été enregistré, sélectionner un emplacement et saisir le nom de fichier dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.

Saisie de la séquence à analyser

Saisir ou coller (« Ctrl+V ») la séquence à analyser dans la zone de texte « Sequence to Analyze » (Séquence à analyser). Lors de la création d'une analyse CpG, saisir la séquence après traitement par le bisulfite.

La saisie de la séquence d'ADN dans le logiciel doit obéir aux règles suivantes :

- Les caractères de saisie autorisés sont A, C, G, T ainsi que les codes IUPAC.
- Les positions variables peuvent être saisies soit sous forme de codes IUPAC, soit sous forme de deux bases possibles séparées d'une barre oblique, par exemple, C/T.
- Les InDels doivent être saisies entre crochets, par exemple [AT].
- La séquence doit contenir au maximum 400 caractères et 100 positions variables.
- Les positions variables impliquant une combinaison de SNP et d'InDels doivent être saisies en associant les symboles / ou les codes IUPAC avec []. Par exemple, [T/A] ou [W] représente un polymorphisme triallélique dont les allèles possible sont T, A ou aucun des deux (délétion).
- Il n'est pas possible de saisir une combinaison de SNP et de bases fixes au sein d'une InDels, par exemple [A/TC].
- Les InDels imbriquées ne sont pas prises en charge, par exemple [ATT[C]G].

Si la séquence à analyser comporte une erreur, un point d'exclamation rouge s'affiche à la fin de la zone de texte. Placer le pointeur de la souris sur le point d'exclamation pour afficher une infobulle expliquant l'erreur. Le ou les caractères posant problème sont indiqués en rouge dans la séquence à analyser.



Comme T/T n'est pas une position variable valable, elle entraîne une erreur « Invalid sequence » (Séquence non valide).

Remarque : Dans le cas d'analyse de schémas de méthylation non classiques, par exemple dans le cas où les méthylations de C ne sont pas suivies de G, il est possible d'analyser ces schémas en mode AQ. Pour analyser ces schémas en mode CpG, saisir plusieurs G supplémentaires dans la zone de texte « Sequence to Analyze » et régler la hauteur attendue des G supplémentaires sur zéro (0). Voir Réglage de la hauteur des barres de l'histogramme, page 33.

Codes IUPAC

Code	Description	Code	Description
A	Adénine	W	T ou A
C	Cytosine	S	C ou G
G	Guanine	B	C, T ou G (pas A)
T	Thymine	D	A, T ou G (pas C)
R	Purine (A ou G)	H	A, T ou C (pas G)
Y	Pyrimidine (C ou T)	V	A, C ou G (pas T)
M	C ou A	N	Base quelconque (A, C, G ou T)
K	T ou G		

Remarque : S, B, V et N ne sont pas valables après le traitement par le bisulfite.

Schémas valables pour une analyse CpG

Les schémas qui n'existent pas après un traitement par le bisulfite ne sont pas valables pour une analyse CpG. Par exemple, GC/TGAC/G n'est pas valable car C/TG est un site CpG dans le sens direct et C/G n'existe pas après le traitement par le bisulfite.

Le site CpG et les SNP suivants peuvent être inclus dans une analyse directe :

- Site CpG : C/TG
- SNP : A/T, A/G, G/T et A/T/G (c'est-à-dire que C ne peut être incluse).

Le site CpG et les SNP suivants peuvent être inclus dans une analyse inverse :

- Site CpG : CG/A
- SNP : A/T, A/C, C/T et A/T/C (c'est-à-dire que G ne peut pas être inclus).

Remarque : Le logiciel ne prend pas en charge l'analyse des sites CpG qui comprennent une position variable supplémentaire, par exemple A/C/TG. Ce type de SNP peut être analysé en saisissant C/TG dans la zone de texte « Sequence to Analyze » et ATCG dans la zone de texte « Dispensation Order » (Ordre de distribution). Lancer le run comme d'habitude. Après l'analyse des sites CpG, passer au mode d'analyse AQ et modifier C/TG en A/C/TG (dans la zone de texte « Sequence to Analyze ») puis analyser la position variable. De la même manière, C/TG/A peut être analysé en saisissant C/TG dans la zone de texte « Sequence to Analyze » et TCGA dans la zone de texte « Dispensation

Order ». Après l'analyse des sites CpG, passer au mode d'analyse AQ et modifier C/TG en C/TG/A (dans la zone de texte « Sequence to Analyze ») puis analyser la position variable.

Définition de l'ordre de distribution

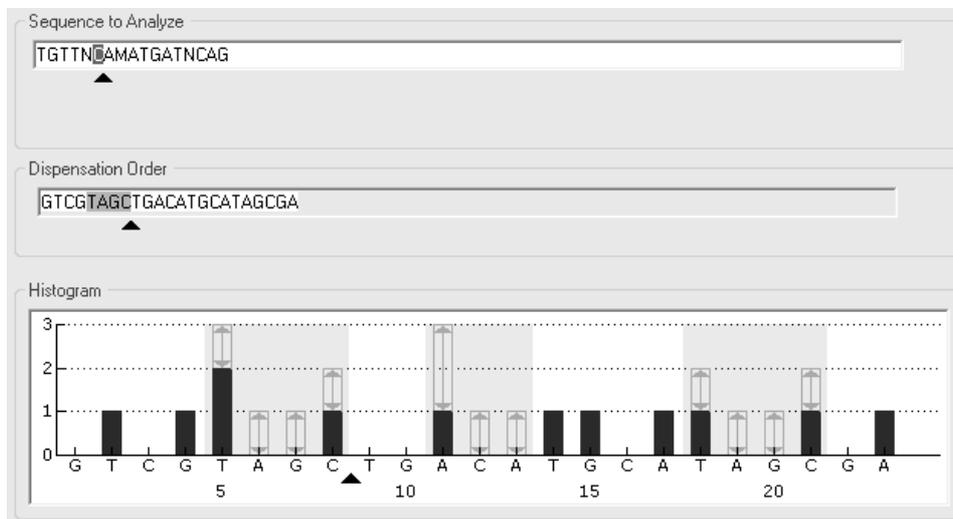
L'ordre de distribution pour la séquence à analyser saisie est défini par le logiciel en cliquant sur le bouton « Generate Dispensation Order ». L'ordre de distribution défini comprend des distributions à blanc afin de s'assurer de l'obtention de la séquence correcte.

Lors de la création d'analyses CpG, l'ordre de distribution doit également prévoir des témoins du traitement par le bisulfite. Ces témoins doivent être ajoutés manuellement par l'utilisateur, après définition de l'ordre de distribution (voir page 26).

Si nécessaire, il est possible de saisir ou de modifier l'ordre de distribution manuellement.

Remarque : En cliquant sur le bouton « Generate Dispensation Order », tout ordre de distribution existant est remplacé.

Remarque : Lors de la sélection de la position d'une base dans la séquence à analyser, la distribution correspondante est mise en évidence par une couleur de fond grise et vice versa.



La flèche sur la séquence à analyser, l'ordre de distribution et l'histogramme indique la position du curseur.

Remarque : Si la dernière position variable de la séquence à analyser est une InDel longue, la distribution se poursuit uniquement jusqu'à obtention de 3 pics variables et à condition que le critère de 5 pics de référence soit rempli. Pour distribuer l'intégralité de l'InDel, ajouter une position variable après l'InDel ou modifier l'ordre de distribution manuellement.

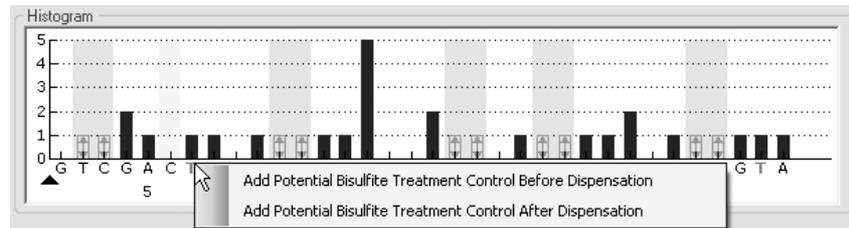
Remarque : S'il n'est pas possible pour la séquence d'être en phase avant la distribution de 32 allèles, la distribution est interrompue. Par exemple, la séquence ACTCDDDDG a pour ordre de distribution ACTC car le polymorphisme à 4 D entraîne un déphasage sur un trop grand nombre d'allèles.

Avertissements de distribution

Si un avertissement est associé à l'ordre de distribution, un point d'exclamation rouge  s'affiche à la fin de la zone de texte « Dispensation Order ». Il est possible de réaliser une analyse avec un avertissement de distribution. Toutefois, il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'évaluation des résultats. Placer le pointeur de la souris sur le point d'exclamation pour afficher une infobulle expliquant l'avertissement.

Avertissement	Action suggérée
« Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information. » (Incertitude sur la séquence due au manque d'informations sur la séquence terminale)	Le problème peut être résolu soit en saisissant plus d'informations sur la séquence, soit en réduisant le nombre de distributions.
« Sequence not in phase at the end of the dispensations. » (Déphasage de la séquence à la fin des distributions)	Le problème peut être résolu en modifiant l'ordre de distribution (manuellement ou en cliquant sur « Generate Dispensation Order ») ou en saisissant plus d'informations sur la séquence. Remarque : Si le problème persiste, la partie déphasée n'est pas analysée.
« The generated dispensation order contains less reference peaks than required. » (Nombre de pics de référence de l'ordre de distribution défini inférieur au nombre requis)	Si possible, saisir plus d'informations sur la séquence et augmenter le nombre de distributions. Pour obtenir la meilleure évaluation de la qualité des résultats possible, il est recommandé de prévoir au moins 5 pics de référence avec des hauteurs de 1, 2 et 3.

Ajout ou suppression de témoins de traitement par le bisulfite (analyses CpG)



Les analyses CpG doivent contenir au moins un témoin interne pour évaluer l'efficacité du traitement par le bisulfite, de préférence en début de séquence. Les bases C non suivies d'une base G dans la séquence ne sont généralement pas méthylées et doivent par conséquent être transformées en T après traitement par le bisulfite et PCR. La réussite du traitement est indiquée par la présence de T seulement et non pas de C à ces emplacements. Dans le cas des analyses inverses, toutes les matrices doivent présenter des A à ces positions et pas de G.

Les positions possibles des témoins du traitement par le bisulfite sont indiquées par une lettre orange en gras sur l'histogramme : **T** pour une analyse directe et **A** pour une analyse inverse.

Pour ajouter un témoin de traitement par le bisulfite, cliquer avec le bouton gauche de la souris sur cette lettre et sélectionner une option dans le menu contextuel. Il est également possible d'ajouter un témoin manuellement en plaçant un C avant ou après un T dans l'ordre de distribution.

Pour supprimer un témoin de traitement par le bisulfite, cliquer avec le bouton gauche de la souris sur le témoin (C pour une analyse directe, G pour une analyse inverse) et sélectionner « Remove Bisulfite Control » (Supprimer le témoin bisulfite) dans le menu contextuel.

Remarque : Dans la séquence avant traitement par le bisulfite, vérifier si les témoins bisulfite suggérés sont de type C converties en T (lues comme G et A dans l'analyse inverse) et s'ils conviennent comme témoins.

Configuration des positions variables

Les positions variables sont configurables dans l'onglet « Variable positions ». Les paramètres disponibles sont énumérés ci-dessous.

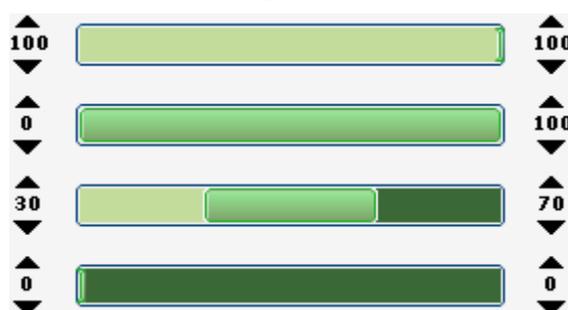
Remarque : En cas de modification de la séquence à analyser (et de la définition d'un nouvel ordre de distribution), les paramètres des positions variables reprennent leur valeur par défaut.

« Position »	Emplacement de la position variable dans la séquence à analyser, en comptant de gauche à droite
« Name » (Nom)	Nom de la position variable. Pour modifier le nom, sélectionner la zone de texte (le contenu est alors mis en surbrillance) ou double-cliquer dessus.
« Type »	Type de position variable : SNP, InDel ou site CpG
« Analyze » (Analyser)	La position variable est analysée si cette option est cochée. Remarque : Cette option n'est pas disponible pour les positions variables impossibles à analyser dans le mode d'analyse actif.
« Methylation ranges » (Plages de méthylation), analyses CpG uniquement	Méthylation attendue des sites CpG. La définition du paramètre pour tous les sites CpG permet une identification aisée, dans les résultats d'analyse, des sites situés en dehors de la plage attendue. <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="584 1070 1273 1137">■ La zone vert clair est inférieure à la plage attendue. <li data-bbox="584 1167 1362 1198">■ La zone verte se trouve dans la plage attendue. <li data-bbox="584 1227 1305 1294">■ La zone vert foncé est supérieure à la plage attendue. Remarque : Il est impossible de définir la méthylation attendue des sites CpG pour lesquels l'option « Analyze » n'est pas cochée. Il est possible de décaler la plage attendue vers la gauche ou vers la droite en maintenant le bouton gauche de la souris enfoncé tout en déplaçant la zone avec la souris. Les flèches servent à augmenter ou réduire la plage attendue. L'étendue de la plage peut également être modifiée comme suit : <ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="584 1787 1401 1939">1. Placer le pointeur de la souris sur l'extrémité gauche ou droite de la zone verte, de manière à ce que le pointeur passe d'une flèche blanche au symbole ⇨ <li data-bbox="584 1968 1385 2040">2. Déplacer la souris vers la gauche ou vers la droite en maintenant le bouton gauche de la souris

enfoncé.

Pour modifier l'ensemble des plages de méthylation d'un coup, maintenir la touche « Shift » (« majuscule ») enfoncée tout en modifiant l'une des plages.

Exemples de plages de méthylation



1. Méthylation attendue = 100 %
2. Méthylation attendue = 0 à 100 %
3. Méthylation attendue = 30 à 70 % (valeur par défaut)
4. Méthylation attendue = 0 %

Pour rétablir les valeurs par défaut des paramètres des onglets « Variable Positions » (Positions Variables) et « Analysis Parameters » (Paramètres d'analyse), cliquer sur « Revert to Default » (Rétablir les valeurs par défaut).

Modification des paramètres d'analyse

Les paramètres d'analyse par défaut ont été définis pour fournir des résultats optimaux pour la plupart des analyses. Si cela s'avère nécessaire au cours de la validation de l'analyse, modifier les paramètres d'analyse pour tenter d'améliorer les résultats.

- Modifier les paramètres d'analyse dans l'onglet « Analysis Parameters », voir ci-dessous.
- Activer ou désactiver les pics de référence et les témoins du traitement par le bisulfite (analyses CpG uniquement), voir page 32.
- Régler la hauteur des barres de l'histogramme, voir page 33.
- Pour activer ou désactiver l'analyse des positions variables et/ou modifier les plages de méthylation attendues (analyses CpG uniquement), voir Configuration des positions variables, page 26.

Veiller à valider les modifications, voir l'Annexe B du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Remarque : Lors de l'utilisation des kits QIAGEN, utiliser les paramètres indiqués dans le manuel correspondant.

Remarque : Toutes les modifications validées sont consignées dans un journal. Pour afficher le journal des modifications d'une analyse, ouvrir le fichier d'analyse et cliquer sur « Show Change Log » (Afficher le journal des modifications).

Modification des paramètres d'analyse dans l'onglet « Analysis Parameters »

Les paramètres d'analyse suivants sont modifiables dans l'onglet « Analysis Parameters ».

« Unsuccessful bisulfite treatment » (Échec du traitement par le bisulfite), analyses CpG uniquement

Ces paramètres indiquent le pourcentage maximal autorisé de séquence non transformée pour atteindre le critère de qualité « Passed » (Succès) et le critère « Check » (À vérifier) pour les sites CpG. Les valeurs saisies sont comparées aux valeurs de hauteur de pic mononucléotidique déterminées par l'algorithme d'analyse.

« Allowed percentage for passed quality » (Pourcentage autorisé pour atteindre le critère de qualité « Passed »)

Pourcentage maximal autorisé de séquence non transformée pour atteindre le critère de qualité « Passed » pour les sites CpG.

La valeur par défaut est de 5 %.

Remarque : La valeur ne peut pas être supérieure à celle du paramètre « Allowed percentage for check quality » (Pourcentage autorisé pour atteindre le critère de qualité « Check »), voir ci-dessous.

« Allowed percentage for check quality »

Pourcentage maximal autorisé de séquence non transformée pour atteindre le critère de qualité « Check » pour les sites CpG. L'avertissement « Uncertain bisulfite conversion at dispensation: » (Incertitude de transformation par le bisulfite à la distribution) suivi d'un ou plusieurs numéros est déclenché pendant l'analyse.

Remarque : Cette règle s'applique uniquement si le critère de qualité « Passed » n'est pas satisfait.

Un pourcentage de séquence non transformée plus élevé que la valeur définie se traduit par une évaluation de la qualité « Failed » (Échec) pour tous les sites CpG. L'avertissement « Failed bisulfite conversion at dispensation: » (Échec de la transformation par le bisulfite à la distribution) suivi d'un nombre est déclenché pendant l'analyse.

La valeur par défaut est de 7 %.

Remarque : La valeur ne peut pas être inférieure à celle du paramètre « Allowed percentage for passed quality », voir ci-dessus.

« **Peak height threshold** » (Seuil de la hauteur de pic)

Ces paramètres définissent la limite inférieure de l'intensité du niveau de pic mononucléotidique au début du pyrogramme.

« Required peak height for passed quality » (Hauteur de pic exigée pour atteindre le critère de qualité « Passed »)

Intensité minimale du signal pour qu'un pic atteigne le critère de qualité « Passed » pour les positions variables.

La valeur par défaut est de 20.

Remarque : La valeur ne peut pas être inférieure à celle du paramètre « Required peak height for check quality » (Hauteur de pic exigée pour atteindre le critère de qualité « Check »), voir ci-dessous.

« Required peak height for check quality »	<p>Intensité minimale du signal pour qu'un pic atteigne le critère de qualité « Check » pour les positions variables. L'avertissement « Uncertain due to low peak height » (Incertitude due à une hauteur de pic faible) est déclenché pendant l'analyse.</p> <p>Remarque : Cette règle s'applique uniquement si le critère de qualité « Passed » n'est pas satisfait.</p> <p>La valeur par défaut est de 10.</p> <p>Une intensité du signal d'un pic inférieure à la valeur définie se traduit par une évaluation de la qualité « Failed » pour les positions variables.</p> <p>L'avertissement « Failed due to low peak height » (Échec dû à une hauteur de pic faible) est déclenché pendant l'analyse.</p> <p>Remarque : La valeur ne peut pas être supérieure à celle du paramètre « Required peak height for passed quality », voir ci-dessus.</p>
« Stringency levels » (Niveaux de rigueur)	<p>La rigueur des avertissements « Pattern deviation in variable positions » (Écart du tracé pour les positions variables) et « Sum deviation in variable positions » (Écart de la somme pour les positions variables) peut être définie sur « Low » (Faible), « Normal » (Normale, valeur par défaut) et « High » (Élevée). Un niveau de rigueur élevé réduit l'écart autorisé.</p>
« Pattern deviation in variable positions »	<p>Écart entre le tracé de pic mesuré pour une position variable et le tracé théorique.</p> <p>Si l'écart est supérieur au niveau de rigueur défini, l'avertissement « Uncertain/Failed due to high pattern deviation in variable position » (Incertitude/Échec dus à un écart important du tracé pour la position variable) est déclenché pendant l'analyse.</p> <p>L'obtention du résultat de qualité « Check » ou « Failed » pour l'analyse dépend de l'ampleur de l'écart.</p>

« Sum deviation in variable positions »

Écart entre la somme de tous les pics mesurée pour une position variable et la somme théorique (déterminée d'après la hauteur de pic mononucléotidique).

Si l'écart est supérieur au niveau de rigueur défini, l'avertissement « Uncertain/Failed due to high sum deviation in variable position » (Incertitude/Échec dus à un écart important de la somme pour la position variable) est déclenché pendant l'analyse. L'obtention du résultat de qualité « Check » ou « Failed » pour l'analyse dépend de l'ampleur de l'écart.

« Parameters » Paramètres

« A-peak reduction factor » (Facteur de compression du pic de A)

Facteur par lequel les intensités du pic de A sont multipliées pour tenir compte du fait que les pics de A sont plus hauts que les autres pics.
La valeur par défaut est de 0,90.

Pour rétablir les valeurs par défaut des paramètres des onglets « Variable Positions » et « Analysis Parameters », cliquer sur « Revert to Default ».

Activation et désactivation des pics de référence et des témoins du traitement par le bisulfite

Les pics invariables, c'est-à-dire les pics ne représentant pas une position variable (y compris les distributions à blanc) sont appelés « pics de référence ». Les pics de référence servent à la fois de référence au calcul du niveau de pic mononucléotidique et de témoins internes lors de l'évaluation de la qualité. Pour obtenir la meilleure évaluation de la qualité des résultats possible, il est recommandé de laisser les pics de référence générés par le logiciel activés.

Un pic de référence est activé ou désactivé, selon son état précédent, en cliquant avec le bouton gauche de la souris sur le losange situé au-dessus du pic concerné sur l'histogramme. Le losange affiche l'état :

- Losange bleu plein : pic de référence activé.
- Losange bleu vide : pic de référence désactivé.

Pour les analyses CpG uniquement : Un témoin de traitement par le bisulfite est activé ou désactivé et/ou défini ou non comme pic de référence, selon son état précédent, en cliquant avec le bouton gauche de la souris sur le losange de témoin de traitement sur l'histogramme. Le losange affiche l'état :

- Losange orange plein : témoin de traitement par le bisulfite et pic de référence activés.
- Losange bleu plein : pic de référence activé mais témoin de traitement par le bisulfite désactivé.
- Losange orange vide : témoin de traitement par le bisulfite et pic de référence désactivés.

Placer le pointeur de la souris sur le losange pour afficher une infobulle expliquant l'action d'un clic.

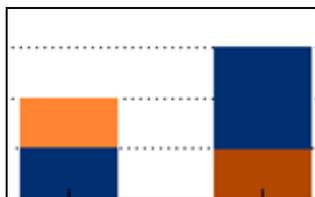
Remarque : Pour basculer entre l'affichage et le masquage des pics de référence sur l'histogramme, cliquer avec le bouton droit de la souris sur l'histogramme et sélectionner « Show Reference Peaks » (Afficher les pics de référence) dans le menu contextuel.

Réglage de la hauteur des barres de l'histogramme

Cette fonctionnalité est utile lorsque l'expérience a permis d'observer un écart reproductible du tracé mesuré par rapport au tracé théorique. Utiliser cette fonction avec précaution.

1. **Appuyer sur la touche « Ctrl » et la maintenir enfoncée tout en cliquant avec le bouton gauche de la souris en haut de la barre de l'histogramme (cliquer lorsque le pointeur passe de la flèche blanche au symbole ).**
2. **Saisir la hauteur dans la zone de texte qui s'ouvre ou augmenter ou diminuer la valeur à l'aide des flèches situées à côté de la zone de texte.**
3. **Pour valider la nouvelle valeur, appuyer sur « Enter ».**

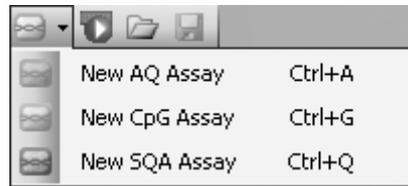
Remarque : Au lieu de supprimer les tracés de méthylation non classiques de la séquence à analyser, par exemple dans le cas où les méthylations de C ne sont pas suivies de G, régler la hauteur attendue pour G sur zéro (0).



Orange clair = diminution de la hauteur
Orange foncé = augmentation de la hauteur

Configuration d'une analyse SQA

Enchaînement des étapes



1. Cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner « **New SQA Assay** » (**Nouvelle analyse SQA**). Un nouveau fichier d'analyse est créé.
2. Renseigner le champ « **Dispensation Order** », voir page 35.
3. **Facultatif** : Saisir des informations sur l'analyse dans la zone de texte « **Assay Note** ».
4. **Avant d'analyser les échantillons, valider l'analyse à l'aide d'un échantillon d'ADN de référence, voir l'Annexe B du Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx.**
5. **Facultatif** : Si cela s'avère nécessaire au cours de la validation de l'analyse, modifier les paramètres d'analyse. Voir page 35.
6. **Facultatif** : Verrouiller l'analyse pour en empêcher la modification à l'aide du bouton « **Lock Assay** » situé en bas de la fenêtre de configuration de l'analyse. Il est impossible de déverrouiller une analyse verrouillée (🔒) réalisée sur l'appareil PyroMark Q24 MDx. C'est-à-dire qu'il est impossible d'en modifier les paramètres ou les résultats une fois l'analyse effectuée.

Remarque : Il est possible de créer un nouveau fichier d'analyse dans le navigateur des raccourcis en cliquant avec le bouton droit de la souris sur le dossier dans lequel enregistrer le fichier de l'analyse puis en sélectionnant « **New Assay** » suivi du type d'analyse souhaité dans le menu contextuel. Saisir le nom du fichier puis appuyer sur « **Enter** ». Pour ajouter un raccourci vers un dossier ou un lecteur, cliquer sur « **Add Folder Shortcut** ».

Remarque : Pour afficher la note sur l'analyse dans une infobulle du navigateur de raccourcis, placer le pointeur de la souris sur le fichier d'analyse.

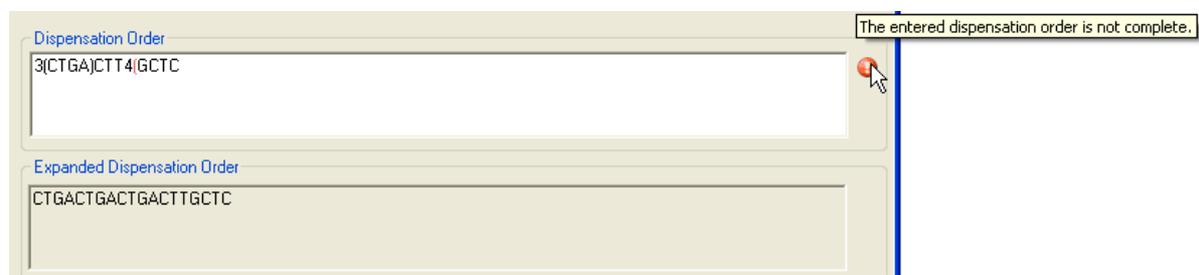
Remarque : Pour enregistrer le fichier, cliquer sur  dans la barre d'outils. Si le fichier n'a encore jamais été enregistré, sélectionner un emplacement et saisir le nom de fichier dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.

Saisie de l'ordre de distribution

Saisir ou coller (« Ctrl+V ») l'ordre de distribution dans la zone de texte « Dispensation Order ». La saisie de l'ordre de distribution dans le logiciel doit obéir aux règles suivantes :

- Les caractères de saisie autorisés sont A, C, G et T.
- Pour répéter un groupe de bases, utiliser des chiffres et des parenthèses, par exemple, « 3(CTGA) » correspond à « CTGACTGACTGA ».

Si l'ordre de distribution comporte une erreur, un point d'exclamation rouge s'affiche à la fin de la zone de texte. Placer le pointeur de la souris sur le point d'exclamation pour afficher une infobulle expliquant l'erreur. Le ou les caractères posant problème sont indiqués en rouge dans l'ordre de distribution.



L'erreur « The entered dispensation order is not complete » (Ordre de distribution saisi incomplet) est due à une parenthèse manquante ou mal placée. Dans cet exemple, il manque une parenthèse fermante.

Modification des paramètres d'analyse

Les paramètres d'analyse par défaut ont été définis pour fournir des résultats optimaux pour la plupart des analyses. Si cela s'avère nécessaire au cours de la validation de l'analyse, modifier les paramètres d'analyse pour tenter d'améliorer les résultats.

- La valeur par défaut du paramètre « Quality Control Window » (Plage de contrôle qualité) de l'onglet « Settings » (Paramètres) est de 20. Si un nombre différent de bases est nécessaire, modifier la valeur en conséquence.
- Modifier les paramètres d'analyse dans l'onglet « Analysis Parameters », voir ci-dessous.

Veiller à valider les modifications, voir l'Annexe B du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Remarque : Lors de l'utilisation des kits QIAGEN, utiliser les paramètres indiqués dans le manuel correspondant.

Remarque : Toutes les modifications validées sont consignées dans un journal. Pour afficher le journal des modifications d'une analyse, ouvrir le fichier

d'analyse et cliquer sur « Show Change Log » en bas de la fenêtre de configuration de l'analyse.

Modification des paramètres d'analyse dans l'onglet « Analysis Parameters »

Les paramètres d'analyse suivants sont modifiables dans l'onglet « Analysis Parameters ».

« Peak height threshold »

Ces paramètres définissent la limite inférieure de l'intensité du niveau de pic mononucléotidique au début du pyrogramme.

« Required peak height for passed quality »

Intensité minimale du signal pour qu'un pic atteigne le critère de qualité « Passed » pour la séquence d'appel de bases.

La valeur par défaut est de 10.

Remarque : La valeur ne peut pas être inférieure à celle du paramètre « Required peak height for check quality », voir ci-dessous.

« Required peak height for check quality »

Intensité minimale du signal pour qu'un pic atteigne le critère de qualité « Check » pour la séquence déterminée par appel de bases. L'avertissement « Uncertain due to low peak height » est déclenché pendant l'analyse.

Remarque : Cette règle s'applique uniquement si le critère de qualité « Passed » n'est pas satisfait.

La valeur par défaut est de 5.

Une intensité du signal d'un pic inférieure à la valeur définie se traduit par une évaluation de la qualité « Failed ». L'avertissement « Failed due to low peak height » est déclenché pendant l'analyse.

Remarque : La valeur ne peut pas être supérieure à celle du paramètre « Required peak height for passed quality », voir ci-dessus.

« Parameters » Paramètres

« A-peak reduction factor »

Facteur par lequel les intensités du pic de A sont multipliées pour tenir compte du fait que les pics de A sont plus hauts que les autres pics.

La valeur par défaut est de 0,90.

« Plus shift compensation » (Compensation du décalage positif)	Si cette option est cochée, une compensation des pics est appliquée pour cause de décalage positif.
« Minus shift compensation » (Compensation du décalage négatif)	Si cette option est cochée, une compensation des pics est appliquée pour cause de décalage négatif.
« Stringent homopolymer scoring » (Évaluation stricte des homopolymères)	Si cette option est cochée, des règles d'évaluation de la qualité plus strictes s'appliquent aux homopolymères. L'avertissement « Peak height deviates from the expected peak level at dispensation: » (Écart de la hauteur de pic par rapport au niveau de pic attendu à la distribution) suivi d'un nombre est déclenché pendant l'analyse.
« Known bases » (Bases connues)	<p>Si l'ordre de distribution comporte des bases connues, il est recommandé de saisir celles-ci afin d'améliorer les résultats d'analyse.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cliquer avec le bouton gauche de la souris sur l'ordre de distribution puis saisir la hauteur dans la zone de texte qui s'ouvre ou augmenter ou diminuer la valeur à l'aide des flèches situées à côté de la zone de texte. 2. Pour valider la valeur, appuyer sur « Enter ».

Pour rétablir les valeurs par défaut des paramètres des onglets « Settings » et « Analysis Parameters », cliquer sur « Revert to Default ».

Configuration d'un run

Enchaînement des étapes

1. Cliquer sur  dans la barre d'outils. Un nouveau fichier de run est créé.
2. Saisir les paramètres du run (voir page 38).
3. Configurer une plaque (c'est-à-dire ajouter une analyse et, si besoin, saisir un ID d'échantillon et une note pour chaque puits utilisé). Voir page 39.
4. Une fois le run configuré et prêt à être lancé sur l'appareil PyroMark Q24 MDx :

Pour imprimer la configuration de la plaque et la liste des volumes de réactifs requis de mélange d'enzymes, de mélange de substrats et de nucléotides, sélectionner « Pre Run Information » dans le menu « Tools » puis, lorsque le rapport s'affiche, cliquer sur .

Fermer le fichier de run et, à l'aide de Windows Explorer, le copier sur l'une des clés USB fournies avec le système. Pour lancer Windows Explorer, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier contenant le fichier de run dans le navigateur des raccourcis puis sélectionner « Explore » dans le menu contextuel. Pour plus d'informations, appuyer sur la touche « F1 » afin d'ouvrir l'aide en ligne de Windows.

Pour le traitement d'une plaque sur l'appareil PyroMark Q24 MDx, voir page 45.

Remarque : Pour imprimer le rapport « Pre-Run Information » en couleur, activer l'option « Print background colors and images » d'Internet Explorer dans « Tools/Internet Options/Advanced/Printing ».

Remarque : Il est possible de créer un nouveau fichier de run dans le navigateur des raccourcis en cliquant avec le bouton droit de la souris sur le dossier souhaité puis en sélectionnant « New Run » dans le menu contextuel. Saisir le nom du fichier puis appuyer sur « Enter ». Pour ajouter un raccourci vers un dossier ou un lecteur, cliquer sur « Add Folder Shortcut ».

Remarque : Pour réaliser un run inspiré d'un run précédent, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le fichier de run traité dans le navigateur de raccourcis et sélectionner « Copy and Rerun » dans le menu contextuel. Seules les données de configuration du run sont copiées, pas les données du run ni de son analyse.

Remarque : Pour enregistrer le fichier, cliquer sur  dans la barre d'outils. Si le fichier n'a encore jamais été enregistré, sélectionner un emplacement et saisir le nom de fichier dans la boîte de dialogue qui s'ouvre.

Saisie des paramètres du run

Les paramètres de run suivants sont disponibles.

- | | |
|---|--|
| « Run name » (Nom du run) | Nom du run donné au moment de l'enregistrement du fichier. Le fait de renommer le fichier modifie également le nom du run. |
| « Instrument method » (Méthode de l'appareil) | Sélectionner la méthode de l'appareil en fonction des réactifs et de la cartouche utilisés pour le run (voir Gestion des méthodes de l'appareil, page 63). |

Remarque : Il est recommandé d'utiliser uniquement les méthodes fournies par QIAGEN.

- « Plate ID » (ID de plaque) **Facultatif** : Saisir l'ID de la plaque PyroMark Q24.
Remarque : Lorsque le pointeur de la souris est placé sur un fichier de run dans le navigateur des raccourcis, une infobulle affiche l'ID de plaque saisi.
- « Barcode » (Code-barres) **Facultatif** : Saisir un code-barres pour la plaque ou, si un lecteur de codes-barres est relié à l'ordinateur, placer le curseur de la souris sur la zone de texte « Barcode » et scanner le code-barres.
- « Reagent ID » (ID de réactif) **Facultatif** : Saisir le numéro de lot des réactifs PyroMark Gold Q24 à utiliser. Ce numéro se trouve sur l'étiquette du produit.
Remarque : Il est recommandé de saisir les ID de réactif de manière à assurer la traçabilité des réactifs en cas de problème.
- « Estimated run time » (Temps de run estimé) Temps de run estimé.
- « Run note » (Note sur le run) **Facultatif** : Saisir une note sur le contenu ou l'objectif du run.

Ajout de fichiers d'analyse pour une plaque

Il existe deux façons d'ajouter une analyse à un puits :

- Sélectionner l'analyse dans le navigateur des raccourcis puis appuyer sur le bouton gauche de la souris et le maintenir enfoncé tout en faisant glisser l'analyse sur le puits.
- Cliquer avec le bouton droit de la souris sur le puits et sélectionner « Load Assay » (Charger l'analyse) dans le menu contextuel.

Remarque : Pour ajouter une analyse à plusieurs puits, sélectionner les puits (voir Sélection de puits, page 19) puis faire glisser l'analyse sur la sélection.

Remarque : Il est impossible d'ajouter une analyse sans ordre de distribution ou d'ajouter deux analyses ou plus ayant le même nom mais des ordres de distribution différents.

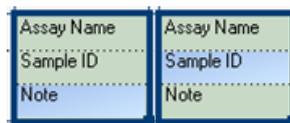
Plate Setup						
	1	2	3	4	5	6
A	AQ assay 1	AQ assay 2	CpG assay 1	CpG assay 2	SQA assay 1	SQA assay 2

Le puits prend la couleur de l'analyse qui lui est associée.

Saisie des ID d'échantillons et des notes

- Pour saisir un ID d'échantillon ou une note, sélectionner la cellule (voir image ci-dessous) et saisir le texte.
- Pour modifier un ID d'échantillon ou une note, sélectionner la cellule (le contenu est alors mis en surbrillance) ou double-cliquer dessus.
- Pour importer un agencement d'échantillons et de notes défini dans un fichier texte (*.tsv ou *.csv), cliquer avec le bouton droit de la souris sur un puits et sélectionner « Insert Sample Layout File » (Insérer un fichier d'agencement d'échantillons) dans le menu contextuel. Pour plus d'informations, voir Définition d'un ID d'échantillon et d'une note en dehors du logiciel, page 42.
- Pour coller l'agencement d'échantillons à partir du presse-papier, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le puits et sélectionner « Paste Sample Layout » (Coller l'agencement d'échantillons) dans le menu contextuel. Pour plus d'informations, voir Définition d'un ID d'échantillon et d'une note en dehors du logiciel, page 42.

Remarque : Les virgules et les points-virgules ne sont pas pris en charge.



La couleur de fond d'une cellule sélectionnée est le bleu.

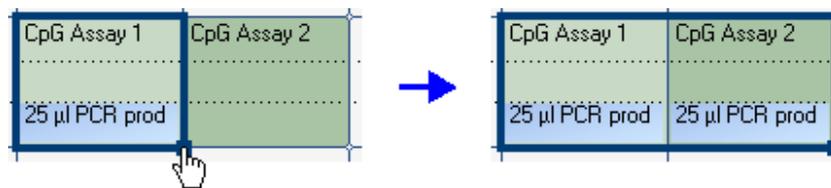
Copie ou suppression du contenu des cellules

- Pour couper le contenu d'une cellule et le placer dans le presse-papier, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la cellule puis sélectionner « Cut » (Couper) dans le menu contextuel.
- Pour copier le contenu d'une cellule et le placer dans le presse-papier, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la cellule puis sélectionner « Copy Cell » (Copier la cellule) dans le menu contextuel ou sélectionner la cellule et appuyer sur « Ctrl+C ».
- Pour coller le contenu du presse-papier dans une cellule ou une sélection de cellules (voir Sélection de puits, page 19), cliquer avec le bouton droit de la souris sur la cellule ou la sélection et sélectionner « Paste » (Coller) dans le menu contextuel ou sélectionner la ou les cellules et appuyer sur « Ctrl+V ».
- Pour supprimer des analyses, des ID d'échantillons ou des notes, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la cellule ou une sélection de cellules et sélectionner « Delete » (Supprimer) dans le menu contextuel ou sélectionner la ou les cellules et appuyer sur « Delete ».

Copier-déplacer du contenu d'une cellule vers d'autres puits

Pour copier-déplacer le contenu d'une cellule vers d'autres puits :

1. **Sélectionner la cellule à copier.**
2. **Placer le pointeur de la souris sur le coin inférieur droit de la zone sélectionnée puis appuyer sur le bouton gauche de la souris et le maintenir enfoncé tout en déplaçant la souris pour modifier la sélection.**
3. **Lorsque le bouton gauche de la souris est relâché, le contenu de la première cellule sélectionnée est collé dans les autres cellules sélectionnées.**



Copier-déplacer de la note « 25 µl PCR prod ».

Copier-déplacer et incrément de l'ID d'échantillon

Un ID d'échantillon se termine par un chiffre qu'il est possible d'incrémenter lors d'un copier-déplacer de l'ID :

1. **Sélectionner la cellule de l'ID d'échantillon.**
2. **Pour incrémenter par ligne :**

Placer le pointeur de la souris sur le coin inférieur droit de la zone sélectionnée.

Appuyer sur la touche « Ctrl » et le bouton gauche de la souris et les maintenir enfoncés tout en déplaçant la souris pour modifier la sélection.

Relâcher en premier le bouton de la souris puis la touche « Ctrl ». Lorsque le bouton gauche de la souris est relâché, l'ID d'échantillon de la première cellule sélectionnée est incrémenté et collé dans les autres cellules sélectionnées.

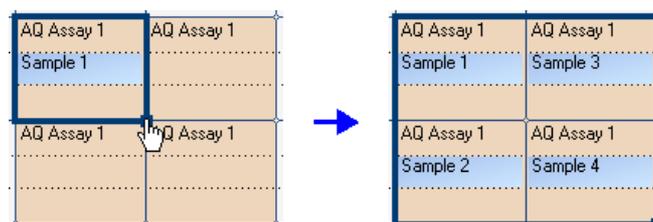
3. **Pour incrémenter par colonne :**

Placer le pointeur de la souris sur le coin inférieur droit de la zone sélectionnée.

Appuyer sur les touches « Shift » (« majuscule ») et « Ctrl » ainsi que le bouton gauche de la souris et les maintenir enfoncés tout en déplaçant la souris pour modifier la sélection.

Relâcher en premier le bouton de la souris puis les touches « Shift » (« majuscule ») et « Ctrl ». Lorsque le bouton gauche de la souris est

relâché, l'ID d'échantillon de la première cellule sélectionnée est incrémenté et collé dans les autres cellules sélectionnées.



L'ID d'échantillon « Sample 1 » est copié et incrémenté par colonne.

Impression et exportation de la configuration d'une plaque sous forme d'image

Pour imprimer la configuration de la plaque ou la copier dans le presse-papier sous forme d'image, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la plaque et sélectionner « Print » (Imprimer) ou « Copy as Image » dans le menu contextuel. Il est possible de coller l'image dans des applications qui prennent en charge le format EMF (Enhanced Metafile).

Définition d'un ID d'échantillon et d'une note en dehors du logiciel

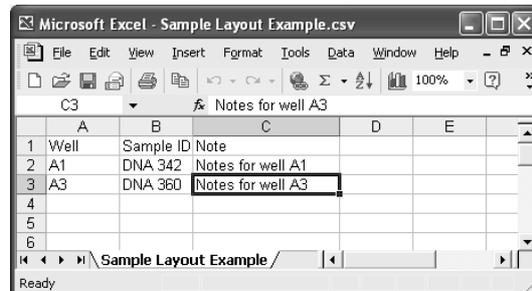
Les fonctions « Import/Insert Sample Layout File » (Importer/Insérer un fichier d'agencement d'échantillons) et « Paste Sample Layout » permettent d'utiliser facilement le même agencement pour plusieurs runs et d'exploiter les informations existantes.

Utilisation de la fonction « Import/Insert Sample Layout File »

Il est possible, par exemple, de générer des fichiers d'agencement d'échantillons et de notes depuis un système de gestion de l'information des laboratoires (SGIL). Il est également possible de créer des fichiers d'agencement dans Microsoft Excel, Notepad ou autre application similaire. Le fichier doit comporter deux ou trois colonnes nommées « Well » (Puits), « Sample ID » (ID d'échantillon) et « Note » (facultatif). Les colonnes doivent être séparées par une tabulation, une virgule ou un point-virgule et chaque ligne doit être délimitée par un saut de ligne. Enregistrer le fichier sous forme de fichier texte à valeurs séparées par des tabulations ou par des virgules (*.tsv, *.txt ou *.csv).

Le fichier d'agencement des échantillons et des notes peut être importé dans :

- un fichier de run existant en cliquant avec le bouton droit de la souris sur un puits dans « Plate Setup » (Configuration de la plaque) et en sélectionnant « Insert Sample Layout File » dans le menu contextuel.
- un nouveau fichier de run en sélectionnant « Import » suivi de « Create New Run from Sample Layout File » dans le menu « File » (Fichier).



Exemple de fichier d'agencement d'échantillons et de notes créé dans Microsoft Excel.

Plate Setup			
	1	2	3
A	DNA 342		DNA 360
	Notes for well A1		Notes for well A3

Résultat après importation du fichier d'agencement d'échantillons et de notes ci-dessus.

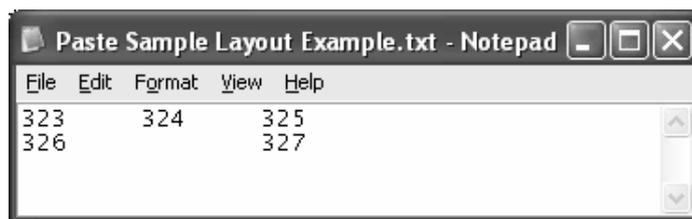
Utilisation de la fonction « Paste sample Layout »

Il est possible, par exemple, de générer et de copier des agencements depuis un SGIL. Les agencements d'échantillons peuvent être copiés de Microsoft Excel, Word, Notepad (Bloc-notes) et d'autres applications similaires. Dans le fichier source, les colonnes d'ID d'échantillon doivent être séparées par une tabulation et chaque ligne doit être délimitée par un saut de ligne.

Pour coller un agencement d'échantillons dans un fichier de run existant :

- 1. Copier l'ensemble des informations du fichier source.**
- 2. Cliquer avec le bouton droit de la souris sur un puits dans « Plate Setup » et sélectionner « Paste Sample Layout » dans le menu contextuel.**

Le logiciel colle les ID d'échantillon sur la plaque, en commençant par le puits A1. (Si des notes ont été saisies pour les puits, elles sont conservées.)



Exemple d'agencement d'échantillons créé dans Microsoft Notepad (Bloc-notes).

Plate Setup			
	1	2	3
A	323	324	325
B	326		327

Résultat après copier-coller de l'agencement d'échantillons créé dans Microsoft Notepad (Bloc-notes).

Révision de la configuration d'une plaque

La zone « Well Information » fournit les renseignements suivants sur un puits sélectionné dans « Plate Setup ».

- Nom du puits
- Type d'analyse (AQ, CpG ou SQA)
- Nom de l'analyse
- ID d'échantillon (si renseigné)
- Séquence à analyser (analyses AQ et CpG uniquement)
- Ordre de distribution
- Note sur le puits (si renseignée)

Lorsque plusieurs puits d'une plaque sont sélectionnés, ce sont les informations du premier puits sélectionné qui sont affichées.

Traitement d'un run sur l'appareil PyroMark Q24 MDx

Enchaînement des étapes

Une fois un run configuré et prêt à être traité sur l'appareil PyroMark Q24 MDx, procéder comme suit :

- 1. Préparer les échantillons.**
- 2. Remplir la cartouche PyroMark Q24 avec les volumes adéquats de réactifs.**
- 3. Charger la cartouche de réactifs et la plaque PyroMark Q24 sur l'appareil.**
- 4. Introduire la clé USB contenant le fichier de run dans le port USB à l'avant de l'appareil.**
- 5. Sélectionner le fichier du run puis lancer le run.**
- 6. Une fois le run terminé et les données transférées sur la clé USB, retirer celle-ci.**
- 7. Décharger la plaque et la cartouche de réactifs.**

Pour plus d'informations, voir la Section 5.5 du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Analyse du run

Enchaînement des étapes

1. Transférer le fichier de run traité de la clé USB sur un ordinateur exécutant le logiciel PyroMark Q24 MDx en insérant la clé dans le port USB de l'ordinateur et en déplaçant le fichier à l'emplacement souhaité avec Windows Explorer.
2. Ouvrir le fichier de run dans le logiciel PyroMark Q24 MDx en sélectionnant « Open » dans le menu « File » ou en double-cliquant dessus (🖱️) dans le navigateur des raccourcis. Si le run comprend plusieurs types d'analyse, choisir le mode d'analyse dans la boîte de dialogue qui s'affiche.

Remarque : Pour mettre à jour le contenu d'un dossier dans le navigateur des raccourcis, cliquer avec le bouton droit de la souris sur ce dossier puis sélectionner « Refresh » dans le menu contextuel.

Remarque : Il est également possible d'ouvrir le fichier de run en double-cliquant dessus dans Windows Explorer.

3. Analyser le run (voir ci-dessous).
4. Afficher les résultats d'analyse (voir page 47).
5. Facultatif : Si nécessaire, modifier le déroulement de l'analyse (voir page 51).
6. Facultatif : Saisir une note d'analyse dans la zone de texte « Note » de l'onglet « Overview » (Vue d'ensemble).

Remarque : Pour développer ou minimiser le champ « Note », cliquer sur « + » ou « - ».

7. Pour enregistrer les résultats d'analyse, cliquer sur 📄 dans la barre d'outils.

Remarque : Il est impossible de modifier les paramètres d'analyse et de saisir une note d'analyse pour les analyses verrouillées (🔒).

Analyse de tous les puits ou d'une sélection de puits

Il y a deux façons de procéder à l'analyse dans l'onglet « Overview » :



Analyser la totalité des puits avec une configuration d'analyse valide pour le mode d'analyse actif.



Analyser une sélection de puits (voir Sélection de puits, page 19).

Remarque : Il est également possible de cliquer avec le bouton droit de la souris sur une sélection puis de choisir « Analyze Selected » (Analyser sélection) dans le menu contextuel.

Pendant l'analyse, une boîte de dialogue contenant une barre de progression, un bouton d'arrêt et le nom du puits en cours d'analyse affiche la progression. Pour arrêter l'analyse, cliquer sur « Stop ».

Remarque : Après analyse d'un puits, celui-ci prend la couleur bleu clair.

Modes d'analyse

Trois modes d'analyse sont proposés sur le logiciel PyroMark Q24 MDx : AQ, CpG et SQA. Pour passer d'un mode à un autre, sélectionner « AQ », « CpG » ou « SQA » dans la barre d'outils. Le génotypage des SNP et des InDels est accessible dans le menu « Reports » du mode AQ.



Remarque : Dans la mesure où le mode CpG ne prend pas en charge l'analyse automatique des SNP, les pourcentages de méthylation et les évaluations de la qualité sont déterminés uniquement pour les sites CpG. Au cours d'une analyse CpG, les SNP peuvent être analysés en mode AQ avec la séquence à analyser saisie dans la configuration de l'analyse CpG. Pour exclure les sites CpG des rapports de SNP, sélectionner l'onglet « Analysis Setup » (Configuration de l'analyse) et décocher l'option « Analyze » pour les positions concernées dans l'onglet « Variable Positions ».

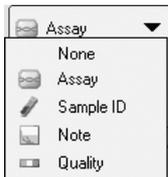
Affichage des résultats d'analyse

En sélectionnant un puits analysé (bleu clair) dans l'onglet « Overview », le pyrogramme correspondant s'affiche et les informations relatives à ce puits (y compris les avertissements) apparaissent dans la zone « Well Information ». Lorsque plusieurs puits sont sélectionnés sur la vue d'ensemble d'une plaque, ce sont les informations sur le puits encadré en orange qui sont affichées.

Vue d'ensemble des résultats

Les informations suivantes sur les puits peuvent être affichées dans la vue d'ensemble de la plaque dans l'onglet « Overview » :

Analyses AQ



Affiche le nom de l'analyse.



Affiche l'ID d'échantillon.

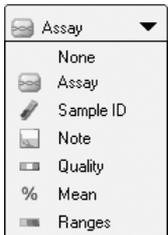


Affiche la note associée au puits.



Affiche la barre de qualité. La barre de qualité indique l'évaluation de la qualité de toutes les positions variables dans le puits ou de toutes les bases dans la séquence d'appel de bases. Voir la légende des couleurs page 49.

Analyses CpG



Affiche le pourcentage moyen de méthylation de tous les sites CpG du puits.



Affiche la barre de méthylation. La barre de méthylation indique le niveau de méthylation de chaque site CpG dans le puits. Voir la légende des couleurs page 50.

Analyses SQA



Affiche l'évaluation de la qualité à la fin de la plage de contrôle qualité. Le nombre de bases incluses par défaut est de 20.

Remarque : Les puits présentant un pic de substrat élevé sont marqués d'une icône d'information (i) dans la vue d'ensemble de la plaque. Ceci est sans conséquence sur les évaluations de la qualité.

Remarque : En cas de modification par l'utilisateur de paramètres d'analyse, d'évaluations de la qualité ou de résultats d'analyse (analyses SQA uniquement), le puits est marqué d'une icône d'avertissement (⚠).

Remarque : En cas de verrouillage d'une analyse, le puits est marqué de l'icône 🔒.

Impression et exportation de la vue d'ensemble d'une plaque sous forme d'image

Pour imprimer la vue d'ensemble de la plaque ou la copier dans le presse-papier sous forme d'image, cliquer avec le bouton droit de la souris sur la vue d'ensemble et sélectionner « Print » ou « Copy as Image » dans le menu contextuel. Il est possible de coller l'image dans des applications qui prennent en charge le format EMF (Enhanced Metafile).

Avertissements d'analyse

En sélectionnant un puits analysé (bleu clair), les avertissements (le cas échéant) s'affichent dans la zone « Well Information ». Les avertissements d'analyse affectent l'évaluation de la qualité de la manière suivante :

- Analyses AQ et CpG : Ils affectent l'évaluation de la qualité de toutes les positions variables ou d'une seule position. Si plusieurs avertissements du même type sont déclenchés, seuls les plus importants sont affichés dans la zone « Well Information ».
- Analyses SQA : Ils affectent l'évaluation de la qualité de la totalité de la séquence ou à partir d'une distribution spécifique et dans le sens direct. Tous les avertissements déclenchés dans la plage de contrôle qualité s'affichent dans la zone « Well Information ».

Les critères de déclenchement et l'effet sur l'évaluation de la qualité de certains avertissements sont modifiables par l'utilisateur dans l'onglet « Analysis Parameters ». Voir Modification des paramètres d'analyse, page 51.

Remarque : En cas d'erreur de distribution, il est recommandé de remplacer la cartouche de réactifs.

Évaluations de la qualité

Les évaluations de la qualité des résultats d'analyse sont représentées par les éléments suivants :

- Barres de qualité (🇪🇺) de la vue d'ensemble de la plaque, voir page 48.
- Couleur de fond des résultats d'analyse (fréquence des allèles ou pourcentage de méthylation sur le pyrogramme, par exemple 96%, ou séquence d'appel de bases), voir page 48.
- Plages de contrôle qualité (●) de la vue d'ensemble de la plaque, voir page 48 (analyses SQA uniquement).
- Les pics du pyrogramme compensé reprennent les couleurs des évaluations de la qualité (analyses SQA uniquement).

Couleurs symbolisant la qualité

- Bleu : Succès
- Jaune : À vérifier
- Rouge : Échec
- Blanc : Non analysé. Soit l'analyse n'est pas prise en charge par le logiciel (par exemple, analyse des SNP en mode CpG), soit la position variable a été désélectionnée par l'utilisateur (analyses AQ et CpG uniquement)

Niveaux de méthylation

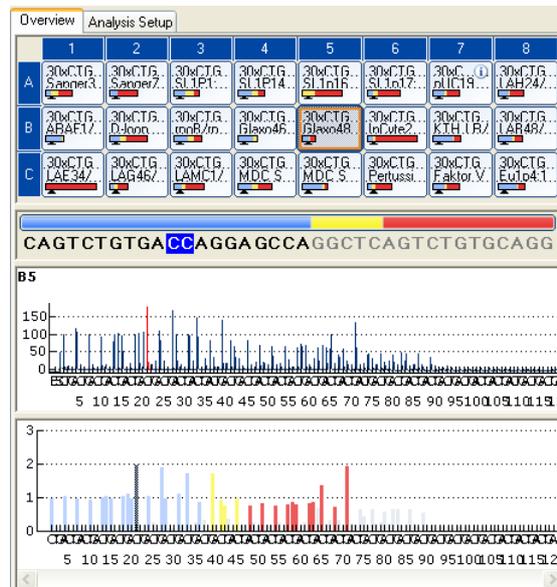
En mode CpG, une barre de méthylation indiquant le niveau de méthylation de chaque site CpG dans le puits est affichée dans l'onglet « Overview », voir page 48.

Couleurs symbolisant la méthylation

- Vert clair : Valeur inférieure à la plage attendue
- Vert : Valeur dans la plage attendue
- Vert foncé : Valeur supérieure à la plage attendue

Affichage et comparaison des pyrogrammes

La sélection d'un puits analysé dans l'onglet « Overview » permet d'afficher le pyrogramme correspondant, ainsi que l'histogramme théorique (analyses AQ ou CpG) ou le pyrogramme compensé (analyses SQA).



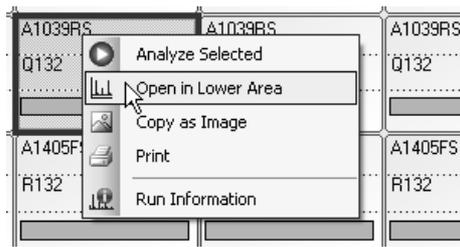
Lors de la sélection d'une base de la séquence d'appel de bases, le pic correspondant est mis en surbrillance dans les deux zones du pyrogramme et vice versa.

Comparaison des pyrogrammes de plusieurs puits

Pour comparer le pyrogramme d'un puits donné (affiché dans la partie supérieure) à celui d'un ou de plusieurs puits (affichés dans la partie inférieure) :

1. Dans l'onglet « Overview », sélectionner le ou les puits (voir Sélection des puits, page 19) à afficher dans la partie inférieure.
2. Cliquer avec le bouton droit de la souris sur une sélection puis choisir « Open in Lower Area » (Ouvrir dans la partie inférieure) dans le menu contextuel.

3. Sélectionner le puits à afficher dans la partie supérieure.



Si les pyrogrammes de plusieurs puits sont affichés dans la partie inférieure, utiliser la barre de défilement pour passer d'un pyrogramme à un autre.

Il est possible de zoomer simultanément sur un pyrogramme dont la séquence à analyser est identique (zoom lié) en cliquant sur , dans le coin supérieur droit de la partie supérieure.

Pour fermer la liste des pyrogrammes de la partie inférieure, cliquer sur **x** dans le coin supérieur droit de la partie inférieure.

Zoom du pyrogramme et affichage de la signification des icônes et des couleurs

Pour plus d'informations sur les icônes et les couleurs employées dans le pyrogramme et sur la fonction de zoom, voir *Pyrogramme*, page 17.

Modification des paramètres d'analyse

Les paramètres d'analyse par défaut ont été définis pour fournir des résultats optimaux pour la plupart des analyses. En cas de modification de ces paramètres, veiller à valider les nouvelles valeurs (voir l'Annexe B du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*).

Remarque : Lors de l'utilisation des kits QIAGEN, utiliser les paramètres indiqués dans le manuel correspondant.

Remarque : Il est impossible de modifier les paramètres d'analyse des analyses verrouillées ()

1. Sélectionner le ou les puits (voir *Sélection des puits*, page 19) dont les paramètres d'analyse sont à modifier.

Remarque : Les modifications s'appliquent uniquement aux puits ayant une analyse et un ordre de distribution en commun avec le puits affiché. Pour modifier les paramètres d'analyse de tous les puits ayant une analyse et un ordre de distribution en commun, il suffit de sélectionner un seul de ces puits.

2. Modifier les paramètres d'analyse dans l'onglet « Analysis Setup » :

Pour activer ou désactiver l'analyse des positions variables et/ou modifier les plages de méthylation attendues (analyses CpG uniquement), voir

Configuration des positions variables, page 26. Pour modifier d'autres paramètres dans le cas d'une analyse AQ ou CpG, voir page 28.

Pour modifier les paramètres d'analyse dans le cas d'une analyse SQA, voir page 35.

Remarque : Il est impossible de modifier le nom de l'analyse, l'ordre de distribution et la note.

3. Une fois les modifications apportées, cliquer sur « Apply » (Appliquer).

Remarque : Il est également possible d'activer ou de désactiver les pics de référence et/ou les témoins de traitement par le bisulfite (analyses CpG uniquement) dans le pyrogramme dans l'onglet « Overview ». Voir les instructions page 32. Pour appliquer les modifications apportées au pyrogramme, cliquer sur le bouton vert . Ce bouton est actif lorsqu'une modification a été apportée.

4. Dans la boîte de dialogue « Apply Analysis Setup » (Appliquer la configuration d'analyse), appliquer les modifications à l'ensemble ou à une sélection de puits :

Pour appliquer les modifications à tous les puits ayant une analyse et un ordre de distribution en commun avec le puits affiché (c'est-à-dire tous les puits en blanc dans la boîte de dialogue « Apply Analysis Setup »), cliquer sur « To All » (À tout).

Pour appliquer les modifications à une sélection de puits (c'est-à-dire les puits en blanc sélectionnés dans la boîte de dialogue « Apply Analysis Setup »), cliquer sur « To Selected » (À la sélection).

Pendant l'analyse, une boîte de dialogue contenant une barre de progression, un bouton d'arrêt et le nom du puits en cours d'analyse affiche la progression. Pour arrêter l'analyse, cliquer sur « Stop ».

5. Pour enregistrer les modifications, cliquer sur .

Remarque : En cas de modification par l'utilisateur de paramètres d'analyse, d'évaluations de la qualité ou de résultats d'analyse (analyses SQA uniquement), le puits est marqué d'une icône d'avertissement () dans l'onglet « Overview ».

Remarque : Toutes les modifications sont consignées dans un journal. Pour afficher le journal d'analyse d'un puits sélectionné, choisir « Analysis Log » dans le menu « Tools ».

Utilisation d'une analyse modifiée pour d'autres runs

Les modifications apportées dans l'onglet « Analysis Setup » ne sont pas enregistrées dans le fichier d'analyse d'origine. Pour utiliser une analyse modifiée pour d'autres runs :

1. **Sélectionner un puits associé à l'analyse modifiée et cliquer sur « Save Assay » (Enregistrer l'analyse). La boîte de dialogue « Save Assay As » (Enregistrer l'analyse sous) s'ouvre.**

2. **Enregistrer les modifications dans le fichier d'origine ou dans un nouveau fichier :**

Sélectionner la destination (dossier) dans la liste déroulante « Save in » (Enregistrer dans).

Saisir le nom de fichier dans la zone de texte « File name » (Nom de fichier) puis cliquer sur « Save ».

Modification des évaluations de la qualité

Pour modifier l'évaluation de la qualité de la fréquence des allèles ou d'un pourcentage de méthylation, cliquer avec le bouton gauche de la souris sur le résultat d'analyse dans le pyrogramme puis sélectionner « Passed », « Check » ou « Failed » dans le menu contextuel.

Pour modifier l'évaluation de la qualité d'une séquence d'appel de bases, placer le pointeur de la souris sur l'extrémité gauche ou droite de la zone « Passed », « Check » ou « Failed » de manière à ce que le pointeur passe d'une flèche blanche au symbole + puis déplacer la souris vers la gauche ou la droite tout en maintenant le bouton gauche enfoncé.



En cas de modification d'une évaluation de la qualité par l'utilisateur, cette information est représentée par une icône d'avertissement (⚠) dans la vue d'ensemble de la plaque dans l'onglet « Overview », par un avertissement dans la zone « Well Information » et, dans le cas d'une analyse AQ ou CpG, par un cadre autour du résultat d'analyse sur le pyrogramme (par exemple, 44%).

Remarque : Toutes les modifications sont consignées dans un journal. Pour afficher le journal d'analyse d'un puits sélectionné, choisir « Analysis Log » dans le menu « Tools ».

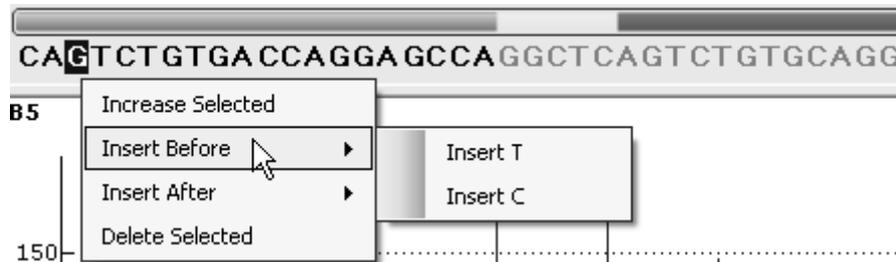
Remarque : Les évaluations de la qualité générées par le logiciel reposent sur des algorithmes d'analyse perfectionnés. Il n'est pas recommandé de modifier les évaluations de la qualité.

Remarque : Il est impossible de modifier les évaluations de la qualité des analyses verrouillées (🔒).

Remarque : Les modifications apportées en mode AQ sont sans conséquence sur les évaluations de la qualité dans les rapports SNP.

Modification des séquences d'appel de bases

Pour modifier une séquence d'appel de bases, cliquer dessus avec le bouton droit de la souris et sélectionner l'option souhaitée.



Remarque : Toutes les modifications sont consignées dans un journal. Pour afficher le journal d'analyse d'un puits sélectionné, choisir « Analysis Log » dans le menu « Tools ».

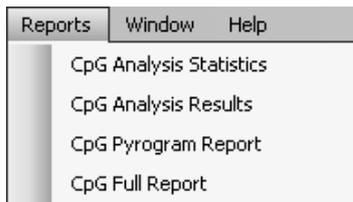
Remarque : En cas de modification de la séquence d'appel de bases, noter que les évaluations de la qualité reposent toujours sur la séquence d'origine (la séquence appelée par le logiciel). Pour modifier les évaluations de la qualité, voir page 53.

Remarque : Il est impossible de modifier la séquence d'appel de bases des analyses verrouillées (🔒).

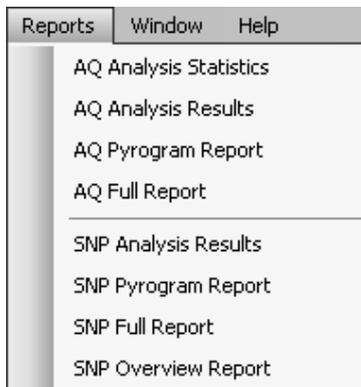
Affichage, impression et enregistrement des rapports d'analyse

Le logiciel PyroMark Q24 MDx propose les rapports d'analyse suivants pour les runs traités.

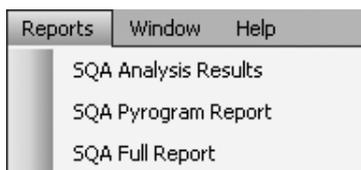
Rapports pour les runs CpG



Rapports pour les runs AQ



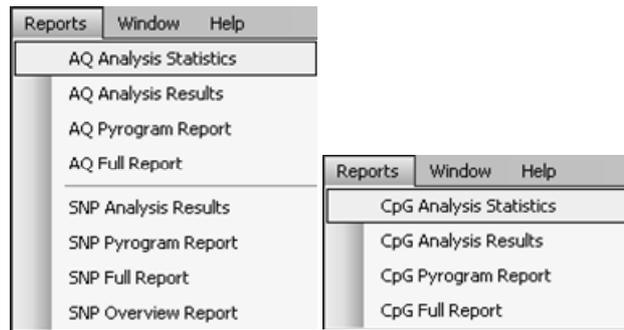
Rapports pour les runs SQA



- Rapport « Analysis Statistics » : Ce rapport fournit les statistiques d'analyse de tous les puits ou d'une sélection de puits.
- Rapport « Analysis Results » : Ce rapport fournit des informations et les résultats d'analyse de tous les puits ou d'une sélection de puits.
- Rapport « Pyrogram Report » : Il fournit des informations et le pyrogramme de tous les puits ou d'une sélection de puits.
- Rapport « Full report » : Il comprend les paramètres et le journal du run, les informations sur les puits et les résultats d'analyse (pyrogramme compris) pour tous les puits ou une sélection de puits.
- Rapport « SNP Overview Report » : Il comprend les génotypes et les évaluations de la qualité de tous les SNP et InDels. Les informations sont présentées sous forme de vues d'ensemble des plaques avec une plaque par numéro de position.

Remarque : Un lecteur de document PDF doit être installé sur l'ordinateur pour pouvoir lire les rapports au format PDF. Il est possible de télécharger Adobe Reader à partir du site www.adobe.com.

Rapport « Analysis Statistics » (Statistiques d'analyse)



Ce rapport fournit les informations suivantes sur les positions variables de tous les puits ou d'une sélection de puits (voir Sélection de puits, page 19) :

- Fréquence moyenne des allèles (rapport QA) ou pourcentage moyen de méthylation (rapport CpG)
- Valeurs maximale et minimale de la fréquence des allèles (analyses QA) ou du pourcentage de méthylation (rapport CpG)
- Écart-type
- Nombre de valeurs et puits utilisés pour chaque calcul
- Le cas échéant, indication de la modification des paramètres d'analyse ou des évaluations de la qualité par l'utilisateur, les puits affectés étant énumérés en début de rapport.

Le rapport peut être enregistré sous forme de fichier texte (*.tsv ou *.csv) ou de fichier HTML (.html). Il est possible d'importer le rapport dans Microsoft Excel ou une autre application capable de prendre en charge les fichiers texte (*.tsv ou *.csv) avec des données séparées par des points-virgules (;) ou des tabulations. Ceci est utile à la réalisation de calculs supplémentaires sur les données.

Options du rapport

La boîte de dialogue « Analysis Statistics Report » (Rapport des statistiques d'analyse) contient les options suivantes :

« All wells/Selected wells » (Tous les puits/sélection de puits) Puits à inclure dans le rapport.

« Assay/Assay and sample ID »
(Analyse/Analyse et ID d'échantillon)

Les statistiques des résultats d'analyse peuvent être regroupées par :

- Analyse
Les puits associés à la même analyse sont regroupés.
- Analyse et ID d'échantillon
Les puits associés à la même analyse et au même ID d'échantillon sont regroupés. Cette option peut être utile lors d'expériences avec des réplicats.

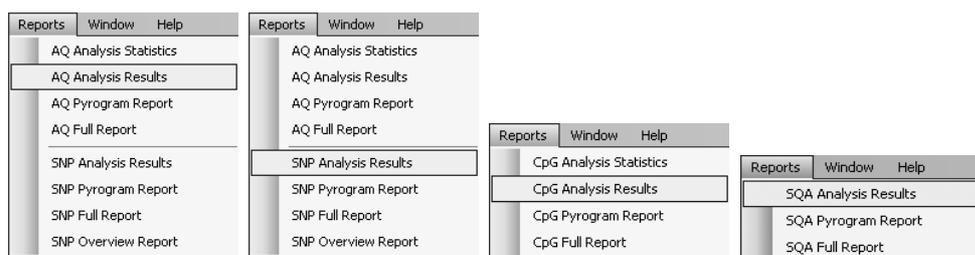
« Passed/Check »
(Succès/À vérifier)

Résultats d'analyse à inclure. Les calculs peuvent être effectués sur les résultats dont l'évaluation de la qualité est « Passed » et/ou « Check ».

Remarque : Si tous les résultats dont l'évaluation de la qualité est « Passed » ou « Check » sont à inclure dans le rapport, il est possible d'exclure des résultats de ce groupe en désactivant l'option « Analyze » pour les positions concernées dans l'onglet « Analysis Setup ». Voir Configuration des positions variables, page 26.

Pour afficher le rapport avant de l'enregistrer ou de l'imprimer, cliquer sur « Preview » (Aperçu).

Rapport « Analysis Results » (Résultats d'analyse)



Ce rapport fournit les informations suivantes pour tous les puits ou une sélection de puits (voir Sélection de puits, page 19) :

- Informations sur le puits (nom du puits, nom de l'analyse et ID d'échantillon)
- Fréquence des allèles (rapport QA), génotypes (rapport SNP), pourcentage de méthylation (rapport CpG) ou séquences d'appel de bases (rapport SQA) ainsi que les évaluations de la qualité
- Pourcentage moyen de méthylation et écart-type de tous les sites CpG ayant atteint le critère de qualité « Passed » pour un puits (rapport CpG uniquement)

- Valeurs maximale et minimale du pourcentage de méthylation pour un puits (rapport CpG uniquement)
- Indication de la modification des paramètres d'analyse, des évaluations de la qualité et des résultats d'analyse par l'utilisateur (rapport SQA uniquement)

Facultatif : Version de l'analyse, notes sur les puits et avertissements d'analyse. Dans les rapports d'analyses AQ et CpG, il est également possible d'inclure les noms ainsi que les évaluations de la qualité d'origine et/ou actives des positions variables.

Le rapport peut être enregistré sous forme de fichier texte (*.tsv ou *.csv) ou de fichier HTML (.html). Il est possible d'importer le rapport dans Microsoft Excel ou une autre application capable de prendre en charge les fichiers texte (*.tsv ou *.csv) avec des données séparées par des points-virgules (;) ou des tabulations. Ceci est utile à la réalisation de calculs supplémentaires sur les données. La première ligne du rapport comporte le nom du run. Les deux ou trois lignes suivantes comportent les en-têtes des colonnes. Chacune des lignes suivant l'en-tête de colonne contient des informations détaillées et les statistiques d'un puits spécifié.

Options du rapport

La boîte de dialogue « Analysis Results Report » (Rapport des résultats d'analyse) contient les options suivantes :

« All wells/Selected wells »	Puits à inclure dans le rapport.
« Sort by row/column »	Ordre de tri des puits.
« All/Passed/Passed + Check/Only Quality Window » (Tout/Succès/Succès + A vérifier/Plage de contrôle qualité uniquement)	Bases de la séquence d'appel à inclure dans le rapport. Cette option est disponible uniquement pour le rapport SQA.
« Note column » (Colonne Note)	Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant les notes des puits est ajoutée au rapport.
« Warnings column » (Colonne Avertissements)	Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant les avertissements d'analyse est ajoutée au rapport.

« Analysis version column » (Colonne Version d'analyse)

Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant la version de l'analyse est ajoutée au rapport.

« Position name column » (Colonne Nom de la position)

Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant le nom des positions variables est ajoutée au rapport.

Cette option n'est pas disponible pour le rapport SQA.

« Quality column » (Colonne Qualité)

Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant les évaluations de la qualité actives est ajoutée au rapport.

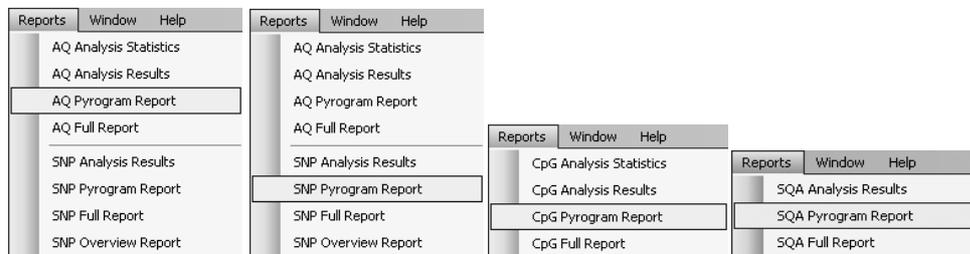
« Original quality column » (Colonne Qualité d'origine)

Lorsque cette option est cochée, une colonne contenant les évaluations de la qualité d'origine est ajoutée au rapport.

Cette option n'est pas disponible pour le rapport SQA.

Pour afficher le rapport avant de l'enregistrer ou de l'imprimer, cliquer sur « Preview ».

Rapport « Pyrogram report » (Rapport du pyrogramme)



Ce rapport fournit des informations sur les puits (nom du puits, nom de l'analyse, ID d'échantillon et note du puits) et le pyrogramme de tous les puits ou d'une sélection de puits (voir Sélection de puits, page 19). Le cas échéant, il indique la modification des paramètres d'analyse, des évaluations de la qualité et des résultats d'analyse par l'utilisateur (rapport SQA uniquement).

Les rapports AQ, SNP et CpG utilisent les informations, les icônes et les couleurs suivantes :

- Nom du puits et séquence à analyser
- Le résultat d'analyse (fréquence des allèles (rapport AQ), géotypes (rapport SNP) ou pourcentage de méthylation (rapport CpG)) est affiché au-dessus de chaque position variable, par exemple (indel) et . La

couleur de fond reflète l'évaluation de la qualité du résultat d'analyse. Voir la légende des couleurs page 49

Remarque : ☐ (en blanc) = désélectionné par l'utilisateur. N/A (en blanc) = analyse non prise en charge par le logiciel, cas par exemple d'une analyse SNP en mode CpG. N/A (en rouge) = analyse impossible en raison du manque de données.

- Si cela est souhaité, les positions variables sont mises en évidence par une couleur de fond bleu-gris.
- Les témoins du traitement par le bisulfite sont mis en évidence par une couleur de fond jaune pâle (rapport CpG uniquement).

Le rapport SQA utilise les informations et les couleurs suivantes :

- Nom du puits
- Séquence d'appel de bases. La couleur de fond d'une base de la séquence reflète l'évaluation de sa qualité. Voir la légende des couleurs page 49
- Si un pyrogramme compensé est inclus, ses pics reprennent les couleurs des évaluations de la qualité.

Options du rapport

La boîte de dialogue « Pyrogram Report » contient les options suivantes :

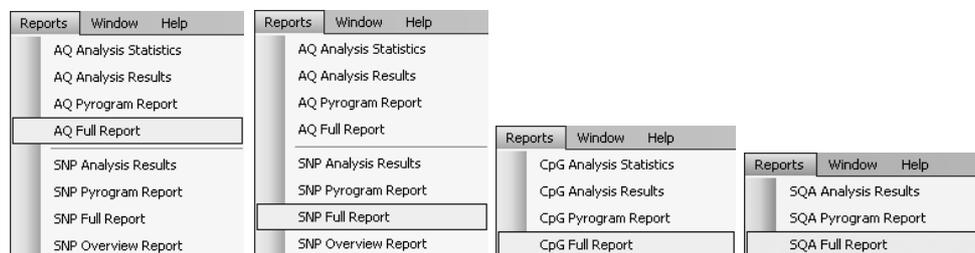
« All wells/Selected wells »	Puits à inclure dans le rapport.
« Number of rows/columns » (Nombre de lignes/colonnes)	Nombre de colonnes et de lignes d'un pyrogramme sur chaque page.
« Sort by row/column »	Ordre de tri des puits.
« Portrait/Landscape » (Portrait/Paysage)	Orientation du papier.
« Highlight variable regions » (Mettre en surbrillance les régions variables)	Lorsque cette option est cochée, les régions variables sont mises en évidence par une couleur de fond bleu-gris. Cette option n'est pas disponible pour le rapport SQA.

- « Show peak levels » (Afficher les niveaux de pic)
 Lorsque cette option est cochée, les niveaux de pic calculés sont affichés sur le pyrogramme.
 Cette option est disponible uniquement pour le rapport SQA.
- « Raw Pyrogram/Compensated Pyrogram » (Pyrogramme brut/Pyrogramme compensé)
 Type de pyrogramme à inclure dans le rapport.
 Cette option est disponible uniquement pour le rapport SQA.
- « Paper size » (Format du papier)
 Format du papier (A4, A3, lettre ou tabloïde)

Pour afficher le rapport avant de l'enregistrer ou de l'imprimer, cliquer sur « Preview ».

Remarque : Un lecteur de document PDF doit être installé sur l'ordinateur pour pouvoir afficher le rapport. Il est possible de télécharger Adobe Reader à partir du site www.adobe.com.

Rapport « Full report » (Rapport complet)



Ce rapport fournit les informations suivantes pour tous les puits ou une sélection de puits (voir Sélection de puits, page 19) :

- Paramètres du run (nom, date et heure du run, méthode de l'appareil, nom de l'appareil, numéro de série, opérateur, ID de plaque, code-barres, ID de réactif et note de run) et journal
- Informations sur le puits (nom du puits, nom de l'analyse, ID d'échantillon et note du puits), version de l'analyse, analyse AQ ou CpG, séquence à analyser
- Pyrogramme. Pour plus d'informations sur les icônes et les couleurs employées dans le pyrogramme, voir Rapport Pyrogram report, page 59
- Fréquence des allèles (rapport QA), génotypes (rapport SNP), pourcentage de méthylation (rapport CpG) ou séquences d'appel de bases (rapport SQA) ainsi que les évaluations de la qualité

- Avertissements d'analyse
- Le cas échéant, indication de la modification des paramètres d'analyse ou des évaluations de la qualité par l'utilisateur, les puits affectés étant énumérés.

Options du rapport

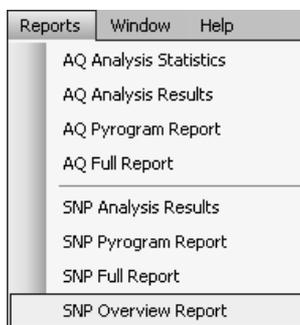
La boîte de dialogue « Full Report » contient les options suivantes :

- | | |
|---------------------------------------|--|
| « All wells/Selected wells » | Puits à inclure dans le rapport. |
| « Raw Pyrogram/Compensated Pyrogram » | Type de pyrogramme à inclure dans le rapport.
Cette option est disponible uniquement pour le rapport SQA. |

Pour afficher le rapport avant de l'enregistrer ou de l'imprimer, cliquer sur « Preview ».

Remarque : Un lecteur de document PDF doit être installé sur l'ordinateur pour pouvoir afficher le rapport. Il est possible de télécharger Adobe Reader à partir du site www.adobe.com.

Rapport « SNP Overview Report » (Rapport d'ensemble des SNP)



Ce rapport comprend les génotypes et les évaluations de la qualité de tous les SNP et InDels. Les informations sont présentées sous forme de vues d'ensemble des plaques avec une plaque par numéro de position. La couleur de fond des puits reflète l'évaluation de la qualité du SNP. Voir la légende des couleurs page 49.

En cas de modification des paramètres d'analyse par l'utilisateur, les puits affectés sont énumérés en début de rapport.

Pour afficher le rapport avant de l'enregistrer ou de l'imprimer, cliquer sur « Preview » dans la boîte de dialogue « SNP Overview Report ».

Position 1								
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	T/T	T/T	C/G	C/G	--	C/C	A/G	A/G
B	-T	-T	C/T	C/T	G/G	G/G	G/G	G/G
C	-T	-T	G/T	G/T	C/G	C/G	G/G	G/G

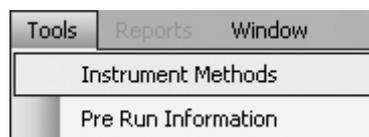
Position 2								
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-/-	-/-			--	A/A	G/G	G/G
B	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G
C	-C	-C			A/A	A/A	G/G	G/G

Extrait d'un rapport. L'option « Analyze » a été désactivée pour les positions 1 et 2 du puits A5. Les puits A3, A4, B3, B4, C3 et C4 ne présentent aucun SNP ni InDel en position 2.

Remarque : Il est possible d'exclure des positions variables du rapport en désactivant l'option « Analyze » correspondante dans l'onglet « Analysis Setup ». Voir Configuration des positions variables, page 26.

Remarque : Le rapport « SNP Overview Report » est disponible uniquement en mode AQ. Un lecteur de document PDF doit être installé sur l'ordinateur pour pouvoir afficher le rapport. Il est possible de télécharger Adobe Reader à partir du site www.adobe.com.

Gestion des méthodes de l'appareil



Il convient de choisir la méthode de l'appareil en fonction des réactifs et de la cartouche de réactifs utilisés pour le run. Le numéro de la méthode imprimé sur la cartouche PyroMark Q24 correspond aux paramètres de la méthode spécifique donnés sur le site www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.

Remarque : Il est recommandé d'utiliser uniquement les méthodes fournies par QIAGEN.

Pour importer une nouvelle méthode :

1. **À partir du site Web ci-dessus, télécharger le fichier de la méthode correspondant au numéro de méthode imprimé sur l'étiquette de la cartouche. L'enregistrer sur l'ordinateur exécutant le logiciel PyroMark Q24 MDx.**
2. **Dans la boîte de dialogue « Instrument Methods », cliquer sur « Import ». La boîte de dialogue « Find Instrument Method » (Recherche d'une méthode de l'appareil) s'ouvre.**
3. **Localiser et sélectionner la méthode à importer puis cliquer sur « Open ».**

Pour créer une nouvelle méthode :

1. Dans la boîte de dialogue « Instrument Method », sélectionner une méthode existante puis cliquer sur « Save As ».
2. Nommer la nouvelle méthode puis appuyer sur « Enter ».
3. Modifier les paramètres de la méthode dans la boîte de dialogue pour qu'ils correspondent à ceux donnés sur la page www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.
4. Cliquer sur « Save ».

Paramètres de la méthode

La boîte de dialogue « Instrument Methods » comporte les paramètres suivants :

« Reagent pressure » (Pression des réactifs)	Pression (en millibar) de distribution des mélanges d'enzymes et de substrats
« Enzyme pulse time » (Durée d'impulsion pour les enzymes)	Durée (en millisecondes) de distribution du mélange d'enzymes
« Substrate pulse time » (Durée d'impulsion pour les substrats)	Durée (en millisecondes) de distribution du mélange de substrats
« Nucleotide pressure » (Pression des nucléotides)	Pression (en millibar) de distribution des nucléotides
« Nucleotide pulse time » (Durée d'impulsion pour les nucléotides)	Durée (en millisecondes) de distribution des nucléotides
« Note »	Remarque concernant la méthode de l'appareil (facultative).

Trucs et astuces

Validation des analyses

Valider les analyses à l'aide d'échantillons d'ADN de référence, voir l'Annexe B du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Journal d'analyse

Toutes les analyses réalisées sont consignées avec leurs paramètres, leur mode (AQ, CpG ou SQA), leur version, les résultats (avertissements d'analyse compris), la date et l'heure de l'analyse et l'opérateur. Pour que les données sur l'opérateur de l'analyse et sur l'auteur d'un fichier d'analyse ou de run soient correctes, tous les utilisateurs doivent se connecter à Windows avec leur propre compte d'utilisateur. Pour plus d'informations sur les comptes d'utilisateur, la connexion et la déconnexion, voir l'aide en ligne de Windows ou contacter l'administrateur système.

Pour afficher le journal d'analyse d'un puits sélectionné, choisir « Analysis Log » dans le menu « Tools ».

Protection des fichiers

Pour protéger un fichier contre la modification par un autre utilisateur, l'enregistrer dans un dossier inaccessible par autrui. Pour plus d'informations, contacter l'administrateur système.

Pour protéger un fichier contre le remplacement accidentel, attribuer au fichier la propriété « Read-only » (Lecture seule) dans Windows Explorer :

- 1. Fermer le fichier dans le logiciel PyroMark Q24 MDx.**
- 2. Ouvrir Windows Explorer et localiser le fichier.**
Pour cela, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le dossier contenant le fichier dans le navigateur des raccourcis puis sélectionner « Explore » dans le menu contextuel.
- 3. Dans Windows Explorer, cliquer avec le bouton droit de la souris sur le fichier puis sélectionner « Properties » (Propriétés) dans le menu contextuel.**
- 4. Dans la boîte de dialogue « Properties » (Propriétés) qui s'ouvre, cocher l'attribut « Read-only » (Lecture Seule) puis cliquer sur « OK ».**

Il convient de sauvegarder les données fréquemment.

Protection des résultats d'analyse

Il est impossible de modifier les paramètres d'analyse et les résultats des analyses verrouillées (🔒). Pour verrouiller une analyse, ouvrir le fichier d'analyse et cliquer sur le bouton « Lock Assay » en bas de la fenêtre de configuration de l'analyse. Verrouiller l'analyse avant de l'ajouter à une plaque.

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Erreur	Commentaires et suggestions
a) En cours d'analyse, présence d'une croix rouge sur les puits dans l'onglet « Overview »	Contactez les Services techniques de QIAGEN.
b) Affichage de la boîte de dialogue « Exception »	Enregistrez le rapport d'erreur et l'envoyez aux Services techniques de QIAGEN pour information. Cliquez sur « Continue » pour poursuivre l'analyse. Si la boîte de dialogue reste affichée, cliquez sur « Quit » (Quitter) et redémarrez le logiciel.
c) Impossible de créer une analyse à partir d'un fichier spécifié du logiciel PyroMark Assay Design	Vérifiez que le type de fichier d'analyse à importer est valide (AQ, CpG ou SNP).

En cas de problème lié à l'analyse, voir la Section Résolution des problèmes du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx*.

Pour plus d'informations, voir la page Foire aux Questions du Centre de support technique : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des Services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations figurant dans ce guide d'utilisation ou sur les technologies d'échantillons et d'analyses (pour les coordonnées, voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Annexe A : Messages du logiciel PyroMark Q24 MDx

Voici une liste de messages d'utilisation, d'avertissement et d'erreur susceptibles de s'afficher dans le logiciel PyroMark Q24 MDx lors de la configuration d'une analyse, d'un run et de l'analyse des données.

Énoncé du message	Explication
Messages généraux liés à la configuration	
« The dispensation order is very long » (Ordre de distribution très long)	L'ordre de distribution contient plus de 200 bases.
Messages généraux liés à l'analyse	
« Not analyzable due to lack of data (overall) » (Analyse impossible en raison du manque de données (général))	Nombre de pics du pyrogramme insuffisant pour analyser les données. Cet avertissement annule tous les autres.
« High pre-sequencing signal » (Signal de préséquençage élevé)	Le pic du substrat est haut comparativement au bruit et au niveau de pic mononucléotidique.
« Uncertain due to baseline drift. » (Incertitude due à une dérive de la ligne de base)	Une dérive anormale de la ligne de base peut avoir un effet négatif sur le résultat.
« Failed due to possible dispensation error at dispensation » (Échec dû à une possible erreur de distribution)	Une erreur a pu se produire lors de la distribution indiquée. Ceci affecte la qualité de tous les sites de la séquence situés après l'erreur.
« No peaks detected between dispensations » (Aucune détection de pic entre les distributions)	Aucun pic n'est détecté bien que tous les nucléotides aient été distribués, ce qui peut indiquer un problème relatif à l'unité de distribution. Ceci affecte la couleur signalant la qualité de tous les sites de la séquence situés après l'erreur.
« Uncertain due to wide peaks » (Incertitude due à des pics larges)	La largeur moyenne de pic dépasse la limite de vérification. Ceci affecte la qualité de tous les sites de la séquence.

Énoncé du message

Explication

Messages de configuration d'analyse en mode AQ

« Invalid sequence » (Séquence non valide)	Erreur de saisie de la séquence à analyser.
« Variable positions with common dispensations cannot be analyzed » (Impossible d'analyser des positions variables avec des distributions communes)	Déphasage des distributions de nucléotide pour plusieurs polymorphismes.
« The generated dispensation order contains less reference peaks than required »	L'analyse comprend moins de 5 pics constants dont la valeur attendue est supérieure à 1.
« Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information »	Le dernier nucléotide de la séquence à analyser a été distribué, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la dernière distribution est inconnue. Remarque : La séquence à analyser doit comporter un nucléotide de plus que l'ordre de distribution.
« Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information » (Analyse de la dernière position variable impossible en raison du manque d'informations sur la séquence terminale)	Aucune informations sur la séquence au-delà de la dernière région variable n'a été saisie, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la position variable est inconnue. Remarque : La séquence à analyser doit comporter un nucléotide de plus que l'ordre de distribution.
« Sequence not in phase at the end of dispensations » (Déphasage de la séquence à la fin des distributions)	La séquence est déphasée après la distribution de tous les nucléotides, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la position variable est inconnue.

Énoncé du message

Explication

« Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations » (Incertitude de quantification : plus de 5 distributions pour la position variable)

La distribution des nucléotides est déphasée au niveau d'un polymorphisme pour plus de 5 distributions, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.

« Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 variable dispensations » (Incertitude de quantification : position variable exigeant plus de 5 distributions variables)

Une position d'InDel exige l'analyse de plus de 5 distributions, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.

« Quantification may be uncertain: the variable position contains a homopolymer. » (Incertitude de quantification : présence d'un homopolymère sur la position variable)

Un homopolymère d'une hauteur ≥ 3 précède ou suit une InDel d'une seule base. L'avertissement indique que le site est très difficile à analyser.

Messages d'analyse en mode AQ

« Analysis not supported » (Analyse non prise en charge)

Le site variable n'est pas pris en charge en mode AQ.

« Deselected by user » (Désélection par l'utilisateur)

Le site variable a été exclu de l'analyse par l'utilisateur.

« The sequence contains less reference peaks than required » (Nombre de pics de référence dans la séquence inférieur au nombre exigé)

Le pyrogramme comprend moins de 5 pics constants dont la valeur attendue est supérieure à 1.

Énoncé du message	Explication
« Not analyzable due to lack of data » (Analyse impossible en raison du manque de données)	Nombre de pics d'un site insuffisant pour analyser les données.
« The variable position contains a homopolymer. » (Présence d'un homopolymère sur la position variable)	Un homopolymère d'une hauteur ≥ 3 précède ou suit une InDel d'une seule base. L'avertissement indique que le site est très difficile à analyser.
« Uncertain due to low signal-to-noise ratio » (Incertitude due à un faible rapport signal/bruit)	La différence entre la somme des pics de la région variable et le bruit n'est pas significative, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.
« Failed due to low signal-to-noise ratio » (Échec dû à un faible rapport signal/bruit)	La différence entre la somme des pics de la région variable et le bruit n'est pas significative, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.
« Uncertain due to low peak height »	Le niveau de pic mononucléotidique au début du pyrogramme est inférieur à celui exigé par le critère de qualité « Passed » défini dans la configuration de l'analyse.
« Failed due to low peak height »	La hauteur du pic en RLU à la position indiquée est inférieure à la valeur prédéfinie pour le critère de qualité « Failed ».
« Uncertain due to high sum deviation in variable position » (Incertitude due à un écart important de la somme pour les positions variables)	La somme des pics d'une région variable n'est pas égale au niveau de pic mononucléotidique attendu à la position du polymorphisme, dépassant la limite de vérification.
« Failed due to high sum deviation in variable position » (Échec dû à un écart important de la somme pour les positions variables)	La somme des pics d'une région variable n'est pas égale au niveau de pic mononucléotidique attendu à la position du polymorphisme, dépassant la limite d'échec.

Énoncé du message

Explication

« Uncertain due to high pattern deviation in variable position »
(Incertitude due à un écart important du tracé pour la position variable)

La meilleure correspondance des tracés de fréquence possibles s'écarte du tracé réel, dépassant la limite de vérification.

« Failed due to high pattern deviation in variable position » (Échec dû à un écart important du tracé pour la position variable)

La meilleure correspondance des tracés de fréquence possibles s'écarte du tracé réel, dépassant la limite d'échec.

« Uncertain surrounding reference sequence pattern » (Incertitude sur le tracé de la séquence de référence environnante)

La hauteur mesurée des pics dans la plage de contrôle qualité s'écarte des valeurs attendues, dépassant la limite de vérification.

« Failed surrounding reference sequence pattern » (Échec du tracé de la séquence de référence environnante)

La hauteur mesurée des pics dans la plage de contrôle qualité s'écarte des valeurs attendues, dépassant la limite d'échec.

« Uncertain due to high peak height deviation at dispensation » (Incertitude due à un écart important de la hauteur de pic à la distribution)

La hauteur mesurée du pic à la distribution spécifiée s'écarte de la valeur attendue, dépassant la limite de vérification.

« Failed due to high peak height deviation at dispensation » (Échec dû à un écart important de la hauteur de pic à la distribution)

La hauteur mesurée du pic à la distribution spécifiée s'écarte de la valeur attendue, dépassant la limite d'échec.

Énoncé du message	Explication
« Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations » (Incertitude du tracé de la séquence environnante pour plus de 5 distributions)	La hauteur mesurée des pics s'écarte des valeurs attendues pour plus de 5 distributions, dépassant la limite de vérification.
« Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations » (Échec du tracé de la séquence environnante pour plus de 5 distributions)	La hauteur mesurée des pics s'écarte des valeurs attendues pour plus de 5 distributions, dépassant la limite d'échec.

Messages d'analyse en mode SNP

« Failed genotype determination » (Échec de la détermination du génotype)	La différence entre la meilleure correspondance du génotype et la seconde est inférieure à la limite d'échec.
« Uncertain genotype determination » (Incertitude de détermination du génotype)	La différence entre la meilleure correspondance du génotype et la seconde est inférieure à la limite de vérification.

Messages de configuration d'analyse en mode CpG

« Invalid sequence »	Erreur de saisie de la séquence à analyser.
« Cannot resolve sequence direction » (Sens de la séquence indétectable)	La séquence à analyser saisie comprend des nucléotides spécifiques de séquences directe ou inverse traitées par le bisulfite.
« A CpG site has to be biallelic » (Un site CpG doit être biallélique.)	Ce message s'affiche lorsque le site CpG indiqué comprend un polymorphisme supplémentaire, par exemple C/T/AG.

Énoncé du message	Explication
« Variable positions with common dispensations cannot be analyzed »	<p>Déphasage des distributions de nucléotide pour plusieurs polymorphismes.</p> <p>Il est impossible d'analyser une région variable évaluée avec des distributions de nucléotide qui s'appliquent à plus d'un polymorphisme (distribution commune). Par exemple, la séquence à analyser A/GC/TCAC avec l'ordre de distribution CATCGTCA n'est pas analysée car les distributions seraient déphasées.</p>
« The generated dispensation order contains less reference peaks than required »	L'analyse comprend moins de 5 pics constants dont la valeur attendue est supérieure à 1.
« Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information »	Le dernier nucléotide de la séquence à analyser a été distribué, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la dernière distribution est inconnue.
« Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information »	Aucune informations sur la séquence au-delà de la dernière région variable n'a été saisie, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la position variable est inconnue.
« Sequence not in phase at the end of dispensations »	La séquence est déphasée après la distribution de tous les nucléotides, ce qui signifie que la hauteur de pic attendue pour la position variable est inconnue.
« Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations »	La distribution des nucléotides est déphasée au niveau d'un polymorphisme pour plus de 5 distributions, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.
Messages d'analyse en mode CpG	
« Analysis not supported »	Le site variable n'est pas pris en charge en mode CpG.
« Deselected by user »	Le site variable a été exclu de l'analyse par l'utilisateur.

Énoncé du message	Explication
« Uncertain bisulfite conversion at dispensation »	Le pic du témoin de traitement par le bisulfite aux distributions indiquées est supérieur à la limite de vérification. Ceci affecte la qualité de tous les sites de la séquence.
« Failed bisulfite conversion at dispensation »	Le pic du témoin de traitement par le bisulfite aux distributions indiquées est supérieur à la limite d'échec. Ceci affecte la qualité de tous les sites de la séquence.
« The sequence contains less reference peaks than required »	Le pyrogramme comprend moins de 5 pics constants dont la valeur attendue est supérieure à 1.
« Not analyzable due to lack of data »	Nombre de pics d'un site insuffisant pour analyser les données.
« Uncertain due to low signal-to-noise ratio »	La différence entre la somme des pics de la région variable et le bruit (inférieur à la limite de vérification) n'est pas significative, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.
« Failed due to low signal-to-noise ratio »	La différence entre la somme des pics de la région variable et le bruit (inférieur à la limite d'échec) n'est pas significative, ce qui peut avoir un effet négatif sur le résultat.
« Uncertain due to low peak height »	Le niveau de pic mononucléotidique au début du pyrogramme est inférieur à celui exigé par le critère de qualité « Passed » défini dans la configuration de l'analyse.
« Failed due to low peak height »	La hauteur du pic en RLU à la position indiquée est inférieure à la valeur prédéfinie pour le critère de qualité « Failed ».
« Uncertain due to high sum deviation in variable position »	La somme des pics d'une région variable n'est pas égale au niveau de pic mononucléotidique attendu à la position du polymorphisme et la différence dépasse la limite de vérification.
« Failed due to high sum deviation in variable position »	La somme des pics d'une région variable n'est pas égale au niveau de pic mononucléotidique attendu à la position du polymorphisme et la différence dépasse la limite d'échec.

Énoncé du message	Explication
« Uncertain due to high pattern deviation in variable position »	La meilleure correspondance des tracés de fréquence possibles s'écarte du tracé réel, dépassant la limite de vérification.
« Failed due to high pattern deviation in variable position »	La meilleure correspondance des tracés de fréquence possibles s'écarte du tracé réel, dépassant la limite d'échec.
« Uncertain surrounding reference sequence pattern »	La hauteur mesurée des pics dans la plage de contrôle qualité s'écarte des valeurs attendues, dépassant la limite de vérification.
« Failed surrounding reference sequence pattern »	La hauteur mesurée des pics dans la plage de contrôle qualité s'écarte des valeurs attendues, dépassant la limite d'échec.
« Uncertain due to high peak height deviation at dispensation »	La hauteur mesurée du pic à la distribution spécifiée s'écarte de la valeur attendue, dépassant la limite de vérification.
« Failed due to high peak height deviation at dispensation »	La hauteur mesurée du pic à la distribution spécifiée s'écarte de la valeur attendue, dépassant la limite d'échec.
« Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations »	La hauteur mesurée des pics s'écarte des valeurs attendues pour plus de 5 distributions, dépassant la limite de vérification.
« Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations »	La hauteur mesurée des pics s'écarte des valeurs attendues pour plus de 5 distributions, dépassant la limite d'échec.

Messages en mode SQA

« Base-calling not consistent with entered known bases » (Appel de bases incohérent avec les bases connues saisies)	Des pics de normalisation définis par l'utilisateur ont été saisis et l'appel de bases résultant est incohérent avec les informations saisies.
« Low peak height » (Faible hauteur de pic)	Le niveau de pic mononucléotidique au début du pyrogramme est inférieur à celui exigé par le critère de qualité « Passed » défini dans la configuration de l'analyse.

Énoncé du message	Explication
« High homopolymer at dispensation » (Grand homopolymère à la distribution)	Un homopolymère comportant plus de 5 nucléotides est présent aux distributions spécifiées.
« Large peak height variation » (Grande variation de la hauteur de pic)	Dans l'ensemble, il y a une grande variation de la hauteur de pic. L'évaluation de la qualité obtenue au départ est de type incertitude ou échec si le phénomène se produit au cours des 5 premières distributions.
« Large peak height variation around dispensation » (Grande variation de la hauteur de pic autour de la distribution)	Il existe une grande variation de la hauteur de pic pour les niveaux mononucléotidiques et binucléotidiques. Les distributions auxquelles cet avertissement s'applique sont spécifiées. L'évaluation de la qualité obtenue est de type incertitude ou échec pour la séquence à partir de la distribution en question.
« Low signal-to-noise ratio (overall) » (Faible rapport signal/bruit (général))	Faible rapport signal/bruit. L'évaluation de la qualité obtenue au départ est de type incertitude ou échec si le phénomène se produit au cours des 5 premières distributions.
« Low signal-to-noise ratio from dispensation » (Faible rapport signal/bruit à partir de la distribution)	Faible rapport signal/bruit. L'évaluation de la qualité obtenue est de type incertitude ou échec pour la séquence à partir de la distribution en question.
« Missing peaks in run starting at dispensation » (Pics de run manquant à partir de la distribution)	Certains pics sont manquants pour le run. Les 4 nucléotides ont été distribués mais aucun pic n'est détecté pour la séquence. L'évaluation de la qualité obtenue est de type incertitude pour le dernier pic détecté.
« Peak height deviates from the expected peak level at dispensation »	La hauteur mesurée du pic à la distribution spécifiée s'écarte fortement de la valeur attendue. Ceci affecte la couleur signalant la qualité de la distribution indiquée.

Énoncé du message

Explication

« Risk for overlaid sequence from dispensation » (Risque de superposition de séquence à partir de la distribution)

Une possible séquence de fond est détectée dans une certaine région. Ceci affecte la couleur signalant la qualité à partir du début de cette région.

« Spurious peak(s) at dispensation » (Présence de faux pics à la distribution)

Des pics indéterminés sont détectés au-delà d'une certaine valeur. Ceci affecte la couleur signalant la qualité à partir de la distribution spécifiée.

« Wide peaks from dispensation » (Pics larges à partir de la distribution)

Détection de pics larges. L'évaluation de la qualité obtenue est de type incertitude à partir de la distribution pour laquelle le phénomène a été observé. L'évaluation de la qualité obtenue au départ est de type incertitude si le phénomène se produit au cours des 5 premières distributions.

Références

QIAGEN tient à jour une grande banque de données en ligne de publications scientifiques utilisant les produits QIAGEN. Des critères de sélection de recherche aident à trouver les articles à l'aide un mot-clé ou en spécifiant l'application, le domaine de recherche, le titre, etc.

Pour une liste complète des références, visiter notre banque de données en ligne « QIAGEN Reference Database » à l'adresse www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou bien contacter les Services techniques de QIAGEN ou le distributeur local.

Marques commerciales : QIAGEN®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (Groupe QIAGEN), Adobe®, Reader® (Adobe Systems Incorporated), Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation).

Accord de licence limitée

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du système PyroMark Q24 MDx accepte les conditions suivantes :

1. Le logiciel PyroMark Q24 MDx ne doit être utilisé que conformément au *Guide d'utilisation du logiciel PyroMark Q24 MDx* et avec les composants fournis avec ce logiciel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce logiciel avec tout autre composant non fourni dans ce logiciel, à l'exception de ce qui est stipulé dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24 MDx* et autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce logiciel et/ou son(s) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce logiciel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du logiciel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les termes précédents. QIAGEN peut faire appliquer des interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au logiciel et/ou à ses composants.

Pour les termes de licence mis à jour, voir www.qiagen.com.

© 2010 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

