

Février 2016

Guide de démarrage rapide du plug-in KRAS Pyro[®]

Conçu pour être installé et utilisé avec les
instruments PyroMark[®] Q24 et le logiciel
PyroMark Q24 version 2.0

À propos du plug-in KRAS Pyro

Le paquet du plug-in KRAS Pyro contient les éléments suivants :

- *Guide de démarrage rapide du plug-in KRAS Pyro*
- Deux fichiers d'installation
- Rapport de référence pour la vérification de la fonctionnalité du plug-in KRAS Pyro

Remarque : le plug-in KRAS Pyro est destiné à être utilisé uniquement en combinaison avec les kits dédiés KRAS Pyro et RAS Extension Pyro indiqués pour les applications décrites dans les manuels respectifs du kit KRAS Pyro et du kit RAS Extension Pyro.

Installation du plug-in KRAS Pyro

Important : le plug-in KRAS Pyro doit être installé sur les **instruments PyroMark Q24 avec le logiciel PyroMark Q24 version 2.0.**

1. Fermer le logiciel PyroMark Q24 2.0 s'il est en cours d'utilisation.
2. Ouvrir le fichier d'installation *.zip et extraire les fichiers.
3. Double-cliquer sur le fichier setup.exe.
4. Suivre les instructions indiquées dans les boîtes de dialogue qui apparaissent.
5. Démarrer le logiciel PyroMark Q24 2.0. KRAS Pyro Plug-in Report apparaît maintenant sous « AQ Add On Reports/KRAS » (rapports de l'option quantification des allèles/KRAS) depuis le menu « Reports » (rapports) en mode AQ.
6. Vérifier la fonctionnalité du plug-in (consulter la section « Vérification de la fonctionnalité du plug-in KRAS Pyro » ci-dessous).

Vérification de la fonctionnalité du plug-in KRAS Pyro

Important : cette vérification doit être effectuée chaque fois qu'un nouveau logiciel est installé ou mis à niveau sur l'ordinateur.

Les étapes suivantes décrivent comment vérifier que le logiciel fonctionne correctement et n'a pas été affecté par d'éventuelles modifications de l'ordinateur.

1. Ouvrir le test « KRAS Example » (exemple pour le gène KRAS) sous « Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/KRAS » (raccourcis/fichiers d'exemples/tests PyroMark/KRAS) dans le raccourci du navigateur.
2. Effectuer une analyse « KRAS codon 12 and 13 » (codons 12 et 13 du gène KRAS) pour tous les puits comme expliqué dans « Analyse d'un test PyroMark Q24 » ci-dessous.
3. Comparer les résultats avec le rapport de référence. Si les résultats sont identiques, la fonctionnalité correcte du plug-in est confirmée.

Analyse d'un test PyroMark Q24

Les étapes suivantes décrivent l'analyse des mutations d'un test KRAS terminé à l'aide du plug-in KRAS Pyro.

1. Insérer la clé USB contenant le fichier de l'analyse effectuée dans le port USB de l'ordinateur.
2. Déplacer le fichier de l'analyse depuis la clé USB vers l'emplacement désiré de l'ordinateur à l'aide de Windows® Explorer.
3. Ouvrez le fichier d'analyse en mode quantification des allèles sur le logiciel PyroMark Q24 soit en sélectionnant « Open » (ouvrir) dans le menu « File » (fichier), soit en double-cliquant sur le fichier (📄) dans le raccourci du navigateur.

4. Sélectionner « AQ Add On Reports/KRAS » et « Codon 12 and 13 » (codons 12 et 13) ou « Codon 61 » depuis « Reports » dans le menu (figure 1).

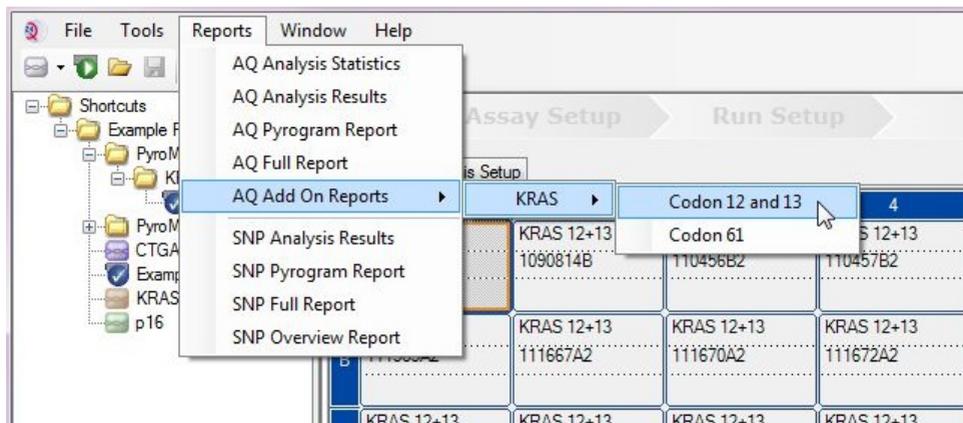


Figure 1. Analyse des mutations d'un test des codons 12 et 13 du gène KRAS terminé à l'aide du plug-in KRAS Pyro.

5. Les puits seront automatiquement analysés afin de détecter toutes les mutations indiquées dans le tableau 1. Les résultats seront présentés dans un tableau récapitulatif (figure 2), suivi des résultats détaillés, qui incluent les Pyrograms® (pyrogrammes) et la qualité de l'analyse.

Important : le plug-in KRAS rapportera la mutation (tableau 1) dont les signaux attendus correspondent le mieux au pyrogramme observé.

Tableau 1. Mutations analysées par le plug-in KRAS Pyro

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V72)
Codon 12 (GGT)				
GAT	G12D	0,6	2,2	521
GTT	G12V	4,9	8	520
TGT	G12C	0,5	2,1	516
AGT	G12S	0,4	1,9	517
GCT	G12A	0,7	2,3	522
CGT	G12R	0,3	1,8	518
Codon 13 (GGC)				
GAC	G13D	0,3	1,9	532
Codon 61 (CAA), tel que testé en orientation antisens (TTG)				
GTG	Q61H	0,8	2,8	554
TAG	Q61L	1,2	3,1	553
TCG	Q61R	1,6	3,5	552
ATG	Q61H	0,7	2,6	555
TTC	Q61E	1,2	3,1	550

* Catalogue des mutations somatiques associées au cancer (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), disponible en ligne sur le site du Sanger Institute à l'adresse www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Summary

NOTE: Only the mutation with the highest frequency is reported.

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				
B4	111672A2	Mutation	21.1	GGT>GTT	G12V	
B5	112307A2	Wildtype				
B6	113070A2	Wildtype				
B7	113188A1	Mutation	55.1	GGT>TGT	G12C	
B8	113200A1	Wildtype				

Figure 2. Résumé des résultats de l'exemple d'une analyse du plug-in KRAS Pyro.

Interprétation des résultats et détection des mutations de faible niveau

Il est fortement recommandé d'inclure un échantillon de type sauvage dans chaque analyse à des fins de comparaison et en tant que contrôle pour le bruit de fond.

Important : Une évaluation de la qualité marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec) peut être provoquée par un modèle de pics inattendu. Cela peut indiquer une mutation

inattendue qui n'est pas analysée par le Plug-in Report. Ces échantillons doivent être analysés manuellement à l'aide du logiciel PyroMark Q24 en prenant en compte le fait qu'ils puissent contenir des mutations inattendues. Consulter le manuel approprié des kits KRAS Pyro ou RAS Extension Pyro pour plus d'informations.

Important : le pyrogramme doit toujours être comparé à l'histogramme, qui figure dans les résultats détaillés du Plug-in Report et peut être affiché dans le logiciel PyroMark Q24 en cliquant avec le bouton droit dans la fenêtre Pyrogram. La présence de pics inattendus dans les pyrogrammes doit être vérifiée. Si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ou inattendue ne permet pas d'expliquer ce phénomène, le résultat ne doit pas être utilisé pour déterminer l'état mutationnel. Il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Important : les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle a été rapportée (fréquence comprise dans la plage allant de la LoD à la LoD + 3 unités %) doivent être réanalysés en duplicats avec un échantillon contenant de l'ADN de contrôle non méthylé. Un avertissement sera émis dans ce cas. L'échantillon doit uniquement être considéré comme positif pour la mutation si les deux duplicats confirment le résultat de l'analyse originale et sont manifestement différents du contrôle normal. Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme de type sauvage.

Important : pour un examen plus approfondi des échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle est rapportée, nous recommandons d'analyser également l'échantillon manuellement dans le logiciel PyroMark Q24, par exemple pour comparaison avec la fréquence mutationnelle dans l'échantillon de contrôle (consulter la section « Protocole 6 : analyse d'un test PyroMark Q24 » dans le manuel approprié du kit RAS Extension Pyro pour plus d'informations). Une fréquence mesurée supérieure à la LoB dans l'échantillon de contrôle indique un bruit de fond supérieur à la normale lors de l'analyse concernée, susceptible d'influer sur la quantification des allèles, en particulier pour les faibles niveaux mutationnels. Dans ce cas, les mutations de faible niveau potentielles rapportées ne permettent pas d'évaluer l'état mutationnel et il est recommandé de réanalyser les échantillons avec une mutation de faible niveau potentielle.

Pour obtenir une information actualisée sur la licence et les clauses de responsabilité spécifiques des produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN® approprié. Les manuels des kits et manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou du distributeur local.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (groupe QIAGEN) ; Windows® (Microsoft Corporation).
1106192 02/2017 © 2017 QIAGEN, tous droits réservés. PROM-8151-003

Pour commander www.qiagen.com/contact | Support technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com