

Février 2017

Guide de démarrage rapide du plug-in BRAF 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 BRAF Pyro

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

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

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

Installation du plug-in BRAF Pyro

Important : le plug-in BRAF 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. BRAF Pyro Plug-in Report apparaît maintenant sous « AQ Add On Reports/BRAF » (rapports de l'option quantification des allèles/BRAF) 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 » ci-dessous).

Vérification de la fonctionnalité du plug-in BRAF 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 « BRAF Example » (exemple pour le gène BRAF) sous « Shortcuts/ Example Files/PyroMark Runs/BRAF » (raccourcis/fichiers d'exemples/tests PyroMark/BRAF) dans le raccourci du navigateur.
2. Effectuer une analyse « BRAF » 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 BRAF est confirmée.

Analyse d'un test PyroMark Q24

Important : le plug-in rapportera la mutation (tableau 1) correspondant le mieux au pyrogramme observé.

Important : certaines mutations ciblées du codon 600 ainsi que des codons 469 à 469 peuvent ne pas être distinguées précisément à des niveaux de mutation inférieurs à 10 %.

Les étapes suivantes décrivent l'analyse des mutations d'un test BRAF terminé à l'aide du plug-in BRAF 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/BRAF » depuis « Reports » dans le menu (figure 1).

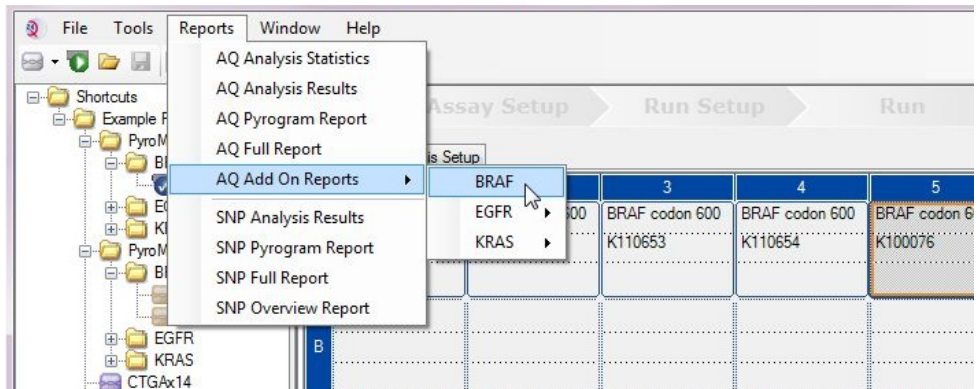


Figure 1. Analyse des mutations d'un test BRAF terminée à l'aide du plug-in BRAF Pyro.

5. Les puits seront automatiquement analysés afin de détecter toutes les mutations indiquées dans le tableau 1. Les résultats pour le codon 600 du gène BRAF et les codons 464 à 469 du gène BRAF seront présentés dans un tableau récapitulatif (figure 2), suivi des résultats détaillés, qui incluent les Pyrograms® (pyrogrammes) et la qualité de l'analyse.

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

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V70)
Codon 600 de BRAF				
1799T>A	V600E	0,4	2,4	476
1799T>G	V600G	0,1	2,1 (5) [†]	6137
1799T>C	V600A	0,2	2,2 (7) [†]	18443
1798G>A	V600M	0,4	2,4	1130
1799_1800TG>AA	V600Ecomplex	0,4	2,4	475
1799_1800TG>AT	V600D	2,3	4,3	477
1798_1799GT>AA	V600K	0,1	2,1	473
1798_1799GT>AG	V600R	0,2	2,2	474
Codons 464–469 du BRAF				
1406G>A	G469E	1,1	3,1	461
1406G>C	G469A	1,2	3,8	460
1406G>T	G469V	1,1	3,1	459
1405_1406GG>TC	G469S	1,5	3,5	458
1397G>A	G466E	4,1	8,6	453
1397G>T	G466V	1,3	3,3	451
1391G>A	G464E	1,3	3,4	449
1391G>T	G464V	0,3	2,3	450

* 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/.

† Niveau de mutation le plus bas pour un échantillon donnant lieu à une fréquence mesurée \geq LoD.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	Codon 600	WT control	No mutation detected				
A2	Codon 600	K110652	Potential low level mutation	4.8	1799T>A	V600E	⚠
A3	Codon 600	K110653	No mutation detected				
A4	Codon 600	K110654	Mutation	34.6	1798_1799GT>AG	V600R	
A5	Codon 600	K100076	Mutation	26.4	1798_1799GT>AA	V600K	
A6	Codon 600	K110282	No mutation detected				
A8	Codon 600	NTC	Failed Analysis				⚠
C1	Codons 464 to 469	WT control	No mutation detected				
C2	Codons 464 to 469	K110652	No mutation detected				
C3	Codons 464 to 469	K110653	Mutation	29.0	1406G>T	G469V	
C4	Codons 464 to 469	K110654	No mutation detected				
C5	Codons 464 to 469	K100076	No mutation detected				
C6	Codons 464 to 469	K110282	Mutation	27.8	1391G>A	G464E	
C8	Codons 464 to 469	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results below.

NOTE: The result must be validated by comparing the observed peaks with the expected peak heights displayed as grey bars. For further information about data evaluation and result interpretation please refer to the handbook.

Figure 2. Résumé des résultats de l'exemple d'une analyse du plug-in BRAF 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 du kit BRAF 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 (voir le protocole correspondant 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).
1106188 02/2017 © 2017 QIAGEN, tous droits réservés. PROM-8090-003

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