

Febbraio 2017

Plug-in GIST RapidScreen Pyro[®] Guida rapida

Per l'installazione e l'utilizzo con strumenti
PyroMark[®] Q24 e software PyroMark Q24
versione 2.0

Informazioni sul plug-in GIST RapidScreen Pyro

Il pacchetto del plug-in GIST RapidScreen Pyro include:

- *Plug-in GIST RapidScreen Pyro Guida rapida*
- due file di installazione
- report di riferimento per la verifica della funzionalità del plug-in GIST RapidScreen Pyro

Nota: Il plug-in GIST RapidScreen Pyro è destinato esclusivamente all'utilizzo in combinazione con il kit *therascreen® GIST RapidScreen Pyro* dedicato (n° cat. 971510) adatto per le applicazioni descritte nel manuale *therascreen GIST RapidScreen Pyro (therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook)*.

Installazione del plug-in GIST RapidScreen Pyro

Importante: Il plug-in GIST RapidScreen Pyro deve essere installato o sullo **strumento PyroMark Q24 con software PyroMark Q24 versione 2.0** o sullo strumento **PyroMark Q24 MDx con software PyroMark Q24 MDx versione 2.0**

Se è aperto, chiudere il software PyroMark Q24 2.0.

1. Aprire il file di installazione *.zip ed estrarre i file.
2. Fare doppio clic sul file setup.exe.
3. Seguire le istruzioni delle finestre di dialogo.
4. Avviare il software PyroMark Q24 2.0. Nel menu "Reports" (Report) della modalità AQ, sotto "AQ Add On Reports/GIST" (Report aggiuntivi AQ/GIST), compare il report del plug-in GIST RapidScreen Pyro.

5. Verificare la funzionalità del plug-in GIST RapidScreen (vedere “Verifica della funzionalità del plug-in GIST RapidScreen” nel seguito).

Verifica della funzionalità del plug-in GIST RapidScreen Pyro

Importante: La verifica dovrebbe essere eseguita ogni volta che si effettua un aggiornamento o l’installazione di nuovo software sul computer.

La seguente procedura illustra come verificare che il software funzioni correttamente e non abbia subito alcun effetto a causa delle modifiche apportate al computer.

6. Aprire la seduta “GIST Example” (Esempio GIST) accessibile nel browser dei collegamenti sotto “Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/GIST” (Collegamenti/File di esempio/sedute PyroMark/GIST).
7. Eseguire un’analisi “GIST” per tutti i pozzetti come descritto in “Analisi di una seduta PyroMark Q24” nel seguito.
8. Confrontare i risultati con il report di riferimento. Se i risultati sono identici, il corretto funzionamento del plug-in è confermato.

Analisi di una seduta PyroMark Q24

La seguente procedura descrive l’analisi delle mutazioni di una seduta GIST conclusa utilizzando il plug-in GIST RapidScreen Pyro.

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.
2. Utilizzando Windows® Explorer, spostare il file della seduta dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.

3. Aprire il file della seduta nella modalità AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (📁) nel browser dei collegamenti.
4. Selezionare "AQ Add On Reports/BRAF" da "Reports" nel menu (Figura 1).

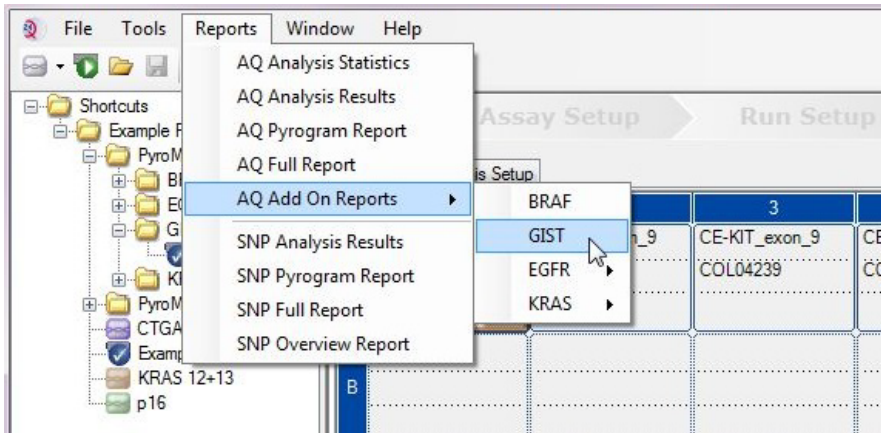


Figura 1. Analisi delle mutazioni di una seduta GIST RapidScreen conclusa utilizzando il plug-in GIST RapidScreen Pyro

5. I pozzetti vengono analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni riportate nella Tabella 1. I risultati per le analisi dell'esone 9 del gene KIT e dell'esone 18 del gene PDGFRA vengono riportati in una tabella riassuntiva (Figura 2), seguita dai risultati dettagliati che includono i tracciati Pyrogram® e la qualità dell'analisi.

Importante: il plug-in riporta la mutazione (Tabella 1) il cui segnale atteso meglio corrisponde al tracciato Pyrogram osservato.

Tabella 1. Mutazioni analizzate mediante il plug-in GIST RapidScreen Pyro

Sostituzione acido nucleico	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
KIT esone 9				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
PDGFRA esone 18				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [§]	0,6	3,6	12396
2524_2535 del12 oppure [†] 2526_2537	del12 D842_H845del oppure [†] I843_D846del [§]	2,2	5,2	737 oppure [†] 96892
2527_2538 del12	I843_D846del [§]	3,0	6,0	12400
2528_2539 del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541 del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532 del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526 delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538 >G [‡]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526 GAC>TAT	D842Y [§]	0,9	3,9	12397

* Fonte: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, disponibile online presso il Sanger Institute all'indirizzo Web www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Le mutazioni 2524_2535del12 e 2526_2537del12 determinano la stessa sostituzione di acido nucleico.

[‡] Le mutazioni 2526_2538 >G e 2524_2526GAC>TAT non possono essere analizzate con la modalità AQ del software PyroMark Q24.

[§] Le mutazioni 2524G>T e 2524_2526 GAC>TAT e rispettivamente 2526_2537 del12 e 2527_2538 del12 determinano la stessa sostituzione di aminoacido.

Summary

Well	Assay Name	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	cKIT Exon 9	COL04237	No mutation detected				
A2	cKIT Exon 9	COL04238	Mutation	51.6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A3	cKIT Exon 9	COL04239	Mutation	29.6	1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	
A4	cKIT Exon 9	COL04240	No mutation detected				
A5	cKIT Exon 9	wt control DNA	No mutation detected				
A8	cKIT Exon 9		Failed Analysis				⚠
C1	PDGFRA Exon 18	COL04237	No mutation detected				
C2	PDGFRA Exon 18	COL04238	Potential low level mutation	4.5	2525A>T	D842V	⚠
C3	PDGFRA Exon 18	COL04239	No mutation detected				
C4	PDGFRA Exon 18	COL04240	Mutation	52.2	2524_2535del12 or 2526_2537del12	D842_H845del or I843_D846del	
C5	PDGFRA Exon 18	wt control DNA	No mutation detected				
C8	PDGFRA Exon 18		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.

Figura 2. Esempio di tabella riassuntiva dei risultati di un'analisi mediante plug-in GIST RapidScreen Pyro.

Interpretazione dei risultati e rilevazione delle mutazioni di basso livello

Si raccomanda vivamente di includere un campione wild-type in ogni seduta a scopo di confronto e come controllo dei livelli di fondo.

Importante: Uno schema inatteso di picchi può determinare una valutazione di qualità "Check" (Controllare) o "Failed" (Non superato). Ciò può indicare una mutazione inattesa che non viene analizzata dal report del plug-in. I campioni interessati da questo fenomeno devono essere analizzati manualmente utilizzando il software PyroMark Q24 e tenendo conto della possibile presenza di mutazioni inattese. Per i dettagli, consultare il manuale del kit *therascreen GIST RapidScreen Pyro*.

Importante: Il tracciato Pyrogram deve sempre essere confrontato con l'istogramma riportato nella sezione dei risultati dettagliati del report del plug-in e può essere visualizzato nel software PyroMark Q24 facendo clic con il tasto destro del mouse nella finestra Pyrogram. Il tracciato Pyrogram deve essere esaminato per valutare la presenza di eventuali picchi imprevisti. Nel caso in cui i picchi misurati non corrispondano all'altezza delle barre dell'istogramma e ciò non possa essere spiegato con mutazioni rare o inattese, non sarà possibile utilizzare il risultato come base per la valutazione dello stato mutazionale. È consigliabile analizzare nuovamente il campione.

Importante: I campioni per i quali è riportata la possibile presenza di una mutazione di basso livello (frequenza compresa tra LOD e LOD + 3 unità percentuali) devono essere nuovamente processati in duplicato con un campione di DNA di controllo non metilato. In tal caso viene generata un'avvertenza. Il campione deve essere considerato positivo per la mutazione soltanto se entrambi i duplicati confermano il risultato dell'analisi generale e sono visibilmente differenti dal campione di controllo normale. In caso contrario, il campione deve essere considerato wild-type.

Importante: Per un esame più accurato dei campioni i cui risultati segnalano una potenziale mutazione di basso livello, è consigliabile eseguire un'ulteriore analisi manuale del campione mediante il software PyroMark Q24, ad esempio un confronto con la frequenza mutazionale del campione di controllo (per le istruzioni dettagliate, vedere il protocollo corrispondente). Se nel campione di controllo viene misurata una frequenza superiore al valore LOB, ciò indica che nella seduta corrispondente è presente un livello di fondo più alto del normale che potrebbe influenzare la quantificazione allelica, in particolare per i livelli mutazionali bassi. In questo caso, i risultati che segnalano la possibile presenza di mutazioni di basso livello non costituiscono una base per la valutazione dello stato mutazionale ed è consigliabile processare nuovamente i campioni con possibili mutazioni di basso livello.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti, consultare il manuale del kit o il

manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN (QIAGEN Technical Services) o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, *therascreen*® (gruppo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106190 02/2017 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati. PROM-8092.002

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