

Manuel du kit *therascreen*[®] GIST RapidScreen Pyro[®]



Version 1

IVD

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.



REF 971510



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

R2 **MAT** 1075556FR



Technologies d'échantillonnage et de dosage QIAGEN

QIAGEN est le premier fournisseur de technologies novatrices d'échantillonnage et de dosage permettant d'isoler et de détecter le contenu de n'importe quel échantillon biologique. Nos produits et services avancés de haute qualité garantissent le succès, de l'échantillon jusqu'au résultat.

QIAGEN fixe les normes en matière de :

- purification d'ADN, d'ARN et de protéines
- dosages d'acides nucléiques et de protéines
- recherche micro-ARN et ARNi
- automatisation des technologies d'échantillonnage et de dosage

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

Sommaire

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	7
Témoins	8
Matériel fourni	9
Contenu du kit	9
Matériel nécessaire mais non fourni	10
Avertissements et précautions	13
Informations de sécurité	13
Précautions générales	14
Stockage et manipulation des réactifs	14
Stockage et manipulation des prélèvements	15
Procédure	15
Isolement d'ADN	15
Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24	17
Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs de PCR fournis avec le kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	20
Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)	23
Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24	25
Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24	29
Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24	31
Interprétation des résultats	35
Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau	35
Guide de dépannage	39
Contrôle qualité	42
Limitations	42
Caractéristiques des performances	43

Limite du blanc et limite de détection	43
Linéarité	45
Précision	46
Évaluation diagnostique	48
Références	49
Symboles	50
Coordonnées	51
Annexe A : Préparation des tests <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	52
Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves	56
Pour commander	58

Utilisation prévue

Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro est un test in vitro de détection basée sur les séquences d'acide nucléique et s'appuyant sur la technologie du Pyrosequencing®, ou pyroséquençage, pour la détection quantitative des mutations au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* humain et de l'exon 18 du gène *PDGFRA* humain dans l'ADN génomique provenant d'échantillons de tissu humain.

Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro vise à fournir aux cliniciens des informations pour les aider dans le traitement de patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) les plus susceptibles de bénéficier de médicaments agissant sur les voies de signalisation, tels que l'imatinib. Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.

À utiliser uniquement avec le système PyroMark® Q24. Les systèmes PyroMark Q24 comprennent les appareils suivants :

- Les instruments PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les stations de travail sous vide PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx
- Les logiciels (version 2.0) PyroMark Q24 et PyroMark Q24 MDx

Le produit est destiné à être utilisé par des professionnels, tels que des techniciens ou des médecins formés aux procédures de diagnostics in vitro, aux techniques de biologie moléculaire et au système PyroMark Q24.

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé avec des échantillons de tissu pulmonaire.

Résumé et explication

Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro est utilisé pour les mesures quantitatives de mutations de l'exon 9 du gène *KIT* et de l'exon 18 du gène *PDGFRA* (voir figure 1). La détection de mutations au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* permet de définir l'utilisation d'une dose d'imatinib appropriée. La détection de mutations au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* contribue à exclure les génotypes moins sensibles ou résistants (1–3).

exon 9 du gène <i>KIT</i>	ATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTGGATGTGCAGACACTAAACTCATCTGGGCCACCGTTTGG AAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTATAGATTCTAGTGCATTCAAGCACAAATGGCACGGTTGAATG TAAGGCTTACAACGATGTGGGCAAGACTTCTGCCTATTTAACTTTGCATTTAAAGGTAACAA CAAAG
exon 18 du gène <i>PDGFRA</i>	TGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATC TGTGACTTTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCTGAACTATGTGTGCGAAAGGCAGT

Figure 1. Contexte génomique des régions séquencées des gènes *KIT* et *PDGFRA* humains (Ensembl IDs ENSG00000157404 et ENSG00000134853). Le codon 503 du gène *KIT* et le codon 842 du gène *PDGFRA* sont encadrés.

Le kit contient 2 tests : le premier pour la détection des mutations au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* et le second pour la détection des mutations au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* (voir figure 2). Les deux régions sont amplifiées séparément par PCR et séquencées dans la région définie. Les séquences entourant les positions définies servent de valeurs maximales de normalisation et de référence pour l'évaluation quantitative et qualitative de l'analyse.

Remarque : les deux tests sont séquencés dans le sens direct.

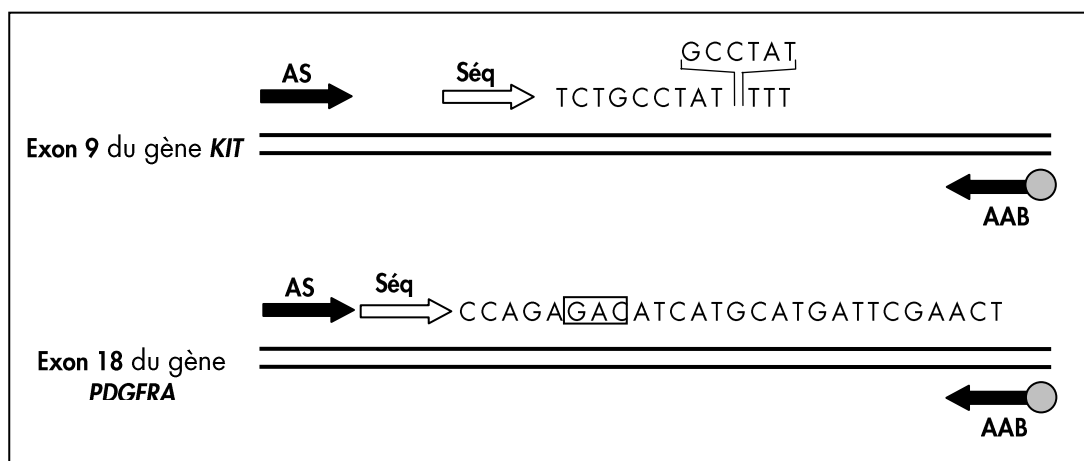


Figure 2. Illustration des tests *KIT*/*PDGFRA*. La séquence indiquée est la séquence analysée pour un échantillon de type sauvage. La position et la séquence de la duplication de 6 pb au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* sont indiquées. L'encadrement correspond au codon 842 de l'exon 18 du gène *PDGFRA*. **AS** : amorces PCR sens ; **AAB** : amorces PCR antisens (B indique une biotinylation) ; **Séq** : amorces de séquence.

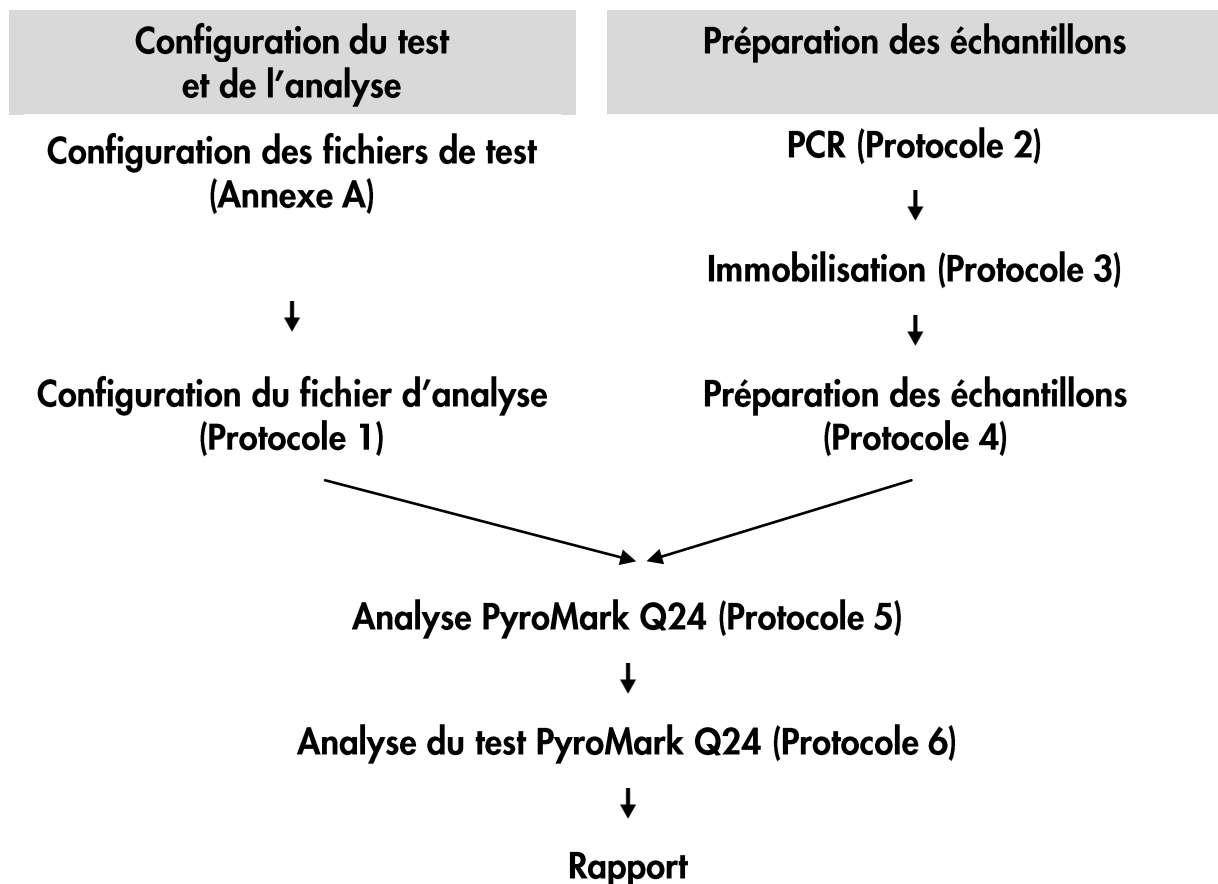
Le produit contient un mélange d'amorce PCR et une amorce de séquence pour chaque test. Les amorces sont livrées en solution. Chaque fiole contient 32 µL de chaque amorce ou mélange d'amorce.

Principe de la procédure

Le déroulement des opérations ci-dessous illustre la procédure de test. Après la PCR à l'aide des amorces ciblant l'exon 9 du gène *KIT* et l'exon 18 du gène *PDGFRA*, les amplicons sont immobilisés sur des billes de sépharose recouvertes de streptavidine (Streptavidin Sepharose® High Performance). L'ADN simple brin est préparé et les amorces de séquence correspondantes s'hybrident avec l'ADN. Les échantillons sont ensuite analysés sur PyroMark Q24 à l'aide de fichiers de configuration du test et d'un fichier d'analyse.

Il est recommandé d'utiliser le GIST RapidScreen Plug-in Report pour analyser le test. Il est possible d'obtenir le GIST RapidScreen Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com. Toutefois, le test peut également être analysé à l'aide de l'outil d'analyse intégré au système PyroMark Q24. La séquence à analyser (« Sequence to Analyze ») peut être ajustée pour la détection des mutations rares après l'analyse (voir « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31, et « Annexe A : Préparation des tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro », page 52).

Déroulement de la procédure *therascreen* GIST RapidScreen Pyro



Témoins

L'ADN témoin non méthylé est inclus dans le kit en tant que témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage. Cet ADN témoin comporte un génotype sauvage dans les régions séquencées à l'aide de ce kit. Il est requis pour l'interprétation correcte des résultats et l'identification des mutations de faible niveau (voir « Interprétation des résultats », page 31). Inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage.

En outre, un témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Matériel fourni

Contenu du kit

Kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (boîte 1/2)

<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	(24)
N° de référence	971510
Nombre de réactions	24
Seq Primer KIT exon 9 (amorces Séq KIT exon 9)	32 µL
Seq Primer PDGFRA exon 18 (amorces Séq PDGFRA exon 18)	32 µL
PCR Primer Mix KIT exon 9 (mélange d'amorces PCR KIT exon 9)	32 µL
PCR Primer Mix PDGFRA exon 18 (mélange d'amorces PCR PDGFRA exon 18)	32 µL
PyroMark PCR Master Mix, 2x (Master Mix PCR PyroMark, 2x)	850 µL
CoralLoad® Concentrate, 10x (concentré CoralLoad®, 10x)	1,2 mL
H ₂ O	3 x 1,9 mL
Unmethylated Control DNA, 10 ng/µl (ADN témoin non méthylé, 10 ng/µL)	100 µL

Tampons et réactifs *therascreen* Pyro (boîte n° 2/2)

Tampons et réactifs <i>therascreen</i> Pyro	
PyroMark Binding Buffer (tampon de liaison PyroMark)	10 mL
PyroMark Annealing Buffer (tampon d'hybridation PyroMark)	10 mL
PyroMark Denaturation Solution (solution de dénaturation PyroMark)*	250 mL
PyroMark Wash Buffer, 10x (tampon de lavage PyroMark, 10x)	25 mL
Enzyme Mixture (mélange d'enzymes)	1 fiole
Substrate Mixture (mélange de substrats)	1 fiole
dATP α S	1 180 μ L
dCTP	1 180 μ L
dGTP	1 180 μ L
dTTP	1 180 μ L
<i>therascreen GIST RapidScreen Pyro Kit Handbook</i> (anglais)	1

* Contient de l'hydroxyde de sodium.

Matériel nécessaire mais non fourni

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

Réactifs

- Kit d'isolement d'ADN (voir « Isolement d'ADN », page 15)
- Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, n° réf. 17-5113-01 ; www.gelifesciences.com)

- Eau ultra-pure (Milli-Q® 18,2 MΩ x cm ou équivalent)

Remarque : le kit contient de l'eau en quantité suffisante pour la PCR, pour l'immobilisation de l'ADN et pour dissoudre le mélange d'enzymes et le mélange de substrats ; une quantité supplémentaire d'eau ultra-pure est requise pour diluer le tampon de lavage PyroMark concentré 10x

- Éthanol (70 %) *

Consommables

- Pointes de pipettes stériles (avec des filtres pour la configuration PCR)
- Plaques de PCR à 24 puits (voir « Plaques à 24 puits recommandées », page 12)
- Film adhésif

Équipement

- Pipettes (adaptables)[†]
- Microcentrifugeuse de paillasse[†]
- Thermocycleur[†] et tubes de PCR adéquats
- PyroMark Q24 (n° réf. 9001513 ou 9001514)^{†‡}
- Logiciel PyroMark Q24 (n° réf. 9019063 ou 9019062)[‡]
- Plaque PyroMark Q24 (n° réf. 979201)[‡]
- Cartouche PyroMark Q24 (n° réf. 979202)[‡]
- Station de travail sous vide PyroMark Q24 (n° réf. 9001515 ou 9001517)^{†‡}
- Agitateur de plaques[†] pour l'immobilisation sur les billes (voir « Agitateurs de plaques recommandés », page 13)
- Bloc chauffant[†] capable d'atteindre les 80 °C

* Ne pas utiliser d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou la méthyléthylcétone.

[†] S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

[‡] Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE. Tous les autres produits de la liste ne sont pas certifiés CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

Plaques à 24 puits recommandées

Les plaques à 24 puits répertoriées dans le tableau 1 sont recommandées avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tableau 1. Plaques à 24 puits recommandées pour une utilisation avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Fabricant	Produit	Numéro de référence
ABgene (Thermo Scientific)	Thermo-Fast PCR Plate	AB-0624
Axygen	24 Well PCR Microplate	PCR-24-C
4titude	FrameStar® Break-a-way 96 wells, clear tubes	4ti-1000
Kisker	Quali – PCR Plates without frame	G030

Agitateurs de plaques recommandés

Les agitateurs de plaques orbitaux répertoriés dans le tableau 2 sont recommandés avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Tableau 2. Agitateurs de plaques recommandés avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Fabricant	Produit	Numéro de référence
Eppendorf	Thermomixer comfort (appareil de base)	5355 000.011
	Thermoblock for MTP	5363 000.012
	Adapter plate for 96 x 0.2 ml PCR tubes to insert in blocks for microtiter plates	5363 007.009
H+P Labortechnik GmbH	Variomag® Teleshake	51410 (115 V = 51410 U)
	Variomag Monoshake	51110 (115 V = 51110 U)

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN® et chaque composant.

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

PyroMark Denaturation Solution



Attention! Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut être corrosif pour les métaux. Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants. Conserver uniquement dans le récipient d'origine. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Pour obtenir des résultats optimaux, se conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse. Il n'est pas recommandé de diluer les réactifs d'une autre manière que celle décrite dans ce manuel dans la mesure où les performances en seraient affectées.
- Les composants de ce produit suffisent pour réaliser 24 réactions au cours de cinq analyses indépendantes maximum.
- Utiliser des pointes de pipettes stériles (avec des filtres pour la configuration PCR).
- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements, témoins positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongeler complètement tous les composants à température ambiante (de 15 à 25 °C) avant de commencer un test.
- Une fois qu'ils sont décongelés, mélanger les composants (en pipetant l'ensemble de manière répétée ou en les passant à l'agitateur à pulsations multiples) et les passer brièvement à la centrifugeuse.
- La détermination du statut mutationnel ne doit jamais reposer sur des résultats marqués « Failed » (échec).

Stockage et manipulation des réactifs

Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro est expédié dans deux boîtes. Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro (boîte 1/2) est expédié sur un lit de carbo-glace. Le Master Mix PCR PyroMark, le concentré CoralLoad, l'ADN témoin non méthylé et toutes les amorces doivent être stockés dès leur réception entre -15 et -30 °C.

Les tampons et réactifs *therascreen Pyro* (boîte 2/2) contenant les tampons, le mélange d'enzymes, le mélange de substrats, la dATP α S, la dCTP, la dGTP et la dTTP (les réactifs pour l'analyse de pyroséquençage) sont expédiés sur des pains de glace. Ces composants doivent être stockés dès leur réception entre 2 et 8 °C. Pour minimaliser la perte d'activité, il est recommandé de garder les mélanges d'enzymes et de substrats dans les fioles fournies.

Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués sont stables pendant au moins 10 jours s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C. Les mélanges d'enzymes et de substrats reconstitués peuvent être congelés et stockés dans leur flacon entre -15 et -30 °C. Les réactifs congelés ne doivent pas subir plus de 6 cycles de congélation/décongélation.

Remarque : les nucléotides ne doivent pas être congelés.

Le kit *therascreen GIST RapidScreen Pyro* est stable jusqu'à la date de péremption du kit s'il est stocké conformément à ces conditions.

Stockage et manipulation des prélèvements

Tous les échantillons doivent être traités comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

Les prélèvements contiennent de l'ADN humain extrait de sang ou d'échantillons fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE).

Les échantillons provenant de patients suivant un traitement à l'héparine ne doivent pas être utilisés. Les échantillons sanguins qui ont été collectés dans des tubes contenant de l'héparine agissant en tant qu'anticoagulant ne doivent pas être utilisés. L'héparine affecte la PCR.

Procédure

Isolement d'ADN

Les performances du système ont été établies à l'aide du kit EZ1[®] DNA Tissue et du kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue pour l'extraction d'ADN humain provenant d'échantillons de tumeurs fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine. Pour le système QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, les performances ont été établies à l'aide d'échantillons de sang de donneur en bonne santé partiellement enrichis en cellules cancéreuses.

Les kits de QIAGEN apparaissant dans le tableau 3 ont été validés pour la purification de l'ADN provenant des échantillons de type humain indiqués,

destinés à être utilisés avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Effectuer la purification de l'ADN conformément aux instructions des manuels du kit.

Tableau 3. Kits de purification de l'ADN recommandés pour l'utilisation avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Matériel d'échantillonnage	Kit d'isolement de l'acide nucléique	Numéro de référence (QIAGEN)
Tissu inclus en paraffine	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	56404
	EZ1 DNA Tissue Kit (48)*	953034
Sang	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit†	61104

* Suivre le protocole d'utilisation du tissu inclus en paraffine. Le kit de tissu ADN EZ1 doit être utilisé en combinant l'utilisation du EZ1 Advanced (n° réf. 9001410 ou 9001411) et du EZ1 Advanced DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018298), du EZ1 Advanced XL (n° réf. 9001492) et du EZ1 Advanced XL DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9018700) ou du BioRobot® EZ1 (n° réf. 9000705, n'est plus disponible) et du EZ1 DNA Paraffin Section Card (n° réf. 9015862).

† Certifié CE-IVD conformément à la directive européenne 98/79/CE.

Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24


Point important avant de commencer

- Si nécessaire, la LoB peut être confirmée à l'aide d'un échantillon de type sauvage pour générer une plaque entière de résultats. Pour obtenir des détails, consulter le protocole EP17-A du CLSI « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ».

À effectuer avant de commencer

- Si le GIST RapidScreen Plug-in Report n'a pas été installé, créer une configuration de test (voir « Annexe A : Préparation des tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro », page 52). Cette configuration n'est nécessaire qu'une seule fois, avant les premiers tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Si le GIST RapidScreen Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/GIST ». Il est possible d'obtenir le GIST RapidScreen Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com.

Procédure

1. **Cliquer sur  dans la barre d'outils.**
Un nouveau fichier d'analyse est créé.
2. **Entrer les paramètres de l'analyse (voir « Paramètres de l'analyse », page 18).**
3. **Préparer la plaque en ajoutant des tests à la fois pour l'exon 9 du gène KIT et pour l'exon 18 du gène PDGFRA aux puits correspondant aux échantillons à analyser.**
Remarque : un échantillon de témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.
Remarque : inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (« Témoins », page 8).
4. **Lorsque l'analyse est paramétrée et prête à être effectuée sur le système PyroMark Q24, imprimer une liste des volumes requis de mélange d'enzymes, mélange de substrats et nucléotides et une liste du paramétrage de la plaque. Sélectionner « Pre Run Information » (informations pré-**

analyse) dans le menu « Tools » (outils), puis lorsque le rapport apparaît, cliquer sur .

5. Fermer le fichier d'analyse et le copier sur une clé USB (fournie avec le système) à l'aide de Windows® Explorer.

Les informations de pré-analyse imprimées peuvent être utilisées comme modèle pour le paramétrage des échantillons (voir « Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) », page 23).

Pour analyser la plaque sur le système PyroMark Q24, voir « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 29.

Paramètres de l'analyse

« Run name » (Nom de l'analyse) :	Le nom de l'analyse est donné lorsque le fichier est sauvegardé. Lorsque le fichier est renommé, le nom de l'analyse change également.
Méthode de l'instrument :	Sélectionner la méthode de l'instrument conformément à la cartouche qui sera utilisée pour l'analyse ; voir les instructions fournies avec les produits.
« Plate ID » (Identifiant de plaque) :	Facultatif : entrer l'identifiant de la plaque PyroMark Q24.
« Barcode » (Code-barres) :	Facultatif : entrer un numéro de code-barres pour la plaque ou, si un lecteur de code-barres est connecté à l'ordinateur, placer le curseur de la souris dans la zone de texte « Barcode » (code-barres) et scanner le code-barres.
Kit and reagent ID (Identifiant du réactif et du kit) :	Facultatif : entrer les numéros de lot des boîtes 1 et 2 du kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro à utiliser. Le numéro de lot se trouve sur l'étiquette du produit. Remarque : nous recommandons d'entrer les deux numéros de lot afin de pouvoir remonter à la source de tout problème inattendu lié au kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro.
Run note (Remarque à propos de l'analyse) :	Facultatif : entrer une remarque à propos des contenus ou des objectifs de l'analyse.

Ajouter des fichiers de test

Il y a deux façons d'ajouter un test à un puits :

- Faire un clic droit sur le puits et sélectionner « Load Assay » (charger le test) dans le menu contextuel.
- Sélectionner le test dans le raccourci du navigateur puis cliquer sur le test et le faire glisser jusqu'au puits.

Les puits répondent à un code de couleurs selon les tests chargés.

Entrer les identifiants et les remarques liées à l'échantillon

Pour entrer un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionner la cellule et saisir le texte.

Pour modifier un identifiant ou une remarque liée à l'échantillon, sélectionner la cellule (le contenu actuel sera sélectionné) ou double-cliquer dessus.

Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs de PCR fournis avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

Ce protocole est utilisé pour les amplifications par PCR d'une région contenant l'exon 9 du gène *KIT* et pour une amplification par PCR séparée d'une région contenant l'exon 18 du gène *PDGFRA* à l'aide du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Points importants avant de commencer

- La HotStarTaq® ADN polymérase contenue dans le Master Mix PyroMark PCR requiert une étape d'activation à **95 °C pendant 15 minutes**.
- Préparer tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour la purification de l'ADN, l'ajout de matrice à la PCR, l'analyse du produit PCR ou la préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage.
- Utiliser des pointes jetables contenant des filtres hydrophobes pour minimaliser la contamination croisée.

À effectuer avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces PCR, les passer brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Si nécessaire, régler la concentration de l'ADN témoin et de l'ADN d'échantillon entre 0,4 et 2 ng/µL.

Procédure

- 1. Décongeler tous les composants nécessaires (voir tableau 4).**
Bien les mélanger avant de les utiliser.
- 2. Préparer un mélange réactionnel pour chaque ensemble d'amorces PCR conformément au tableau 4.**

Le mélange réactionnel contient généralement tous les composants nécessaires à la PCR excepté l'échantillon.

Préparer un volume de mélange réactionnel supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses de PCR à effectuer.

Tableau 4. Préparation du mélange réactionnel pour chaque mélange d'amorce PCR

Composant	Volume/réaction
Master Mix PCR PyroMark, 2x	12,5 µL
Concentré CoralLoad 10x	2,5 µL
Amorce PCR KIT exon 9 ou Amorce PCR PDGFRA exon 18	1 µL
Eau (H ₂ O, fournie)	4 µL
Volume total	20 µL

3. Mélanger complètement le mélange réactionnel et en distribuer 20 µL dans chaque tube de PCR.

Il n'est pas nécessaire de garder les tubes de PCR sur un lit de glace étant donné que la HotStarTaq ADN polymérase est inactive à température ambiante.

4. Ajouter 5 µL d'ADN matrice (entre 2 et 10 ng d'ADN génomique) aux tubes de PCR individuels (voir le tableau 5) et bien mélanger.

Remarque : un échantillon de témoin négatif (sans ADN matrice) doit être inclus dans chaque configuration PCR pour au moins un test.

Remarque : inclure un échantillon avec ADN témoin non méthylé dans chaque test réalisé au cours des analyses de pyroséquençage (voir « Témoins », page 8).

Table 5. Préparation de la PCR

Composant	Volume/réaction
Mélange réactionnel	20 µL
ADN de l'échantillon	5 µL
Volume total	25 µL

5. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant à l'aide des conditions décrites dans le tableau 6.

Tableau 6. Protocole de cycle optimisé

			Commentaires
Étape d'activation initiale :	15 minutes	95 °C	La HotStarTaq ADN polymérase est activée par cette étape de réchauffement.
Cycle en 3 étapes :			
Dénaturation	20 secondes	95 °C	
Hybridation	30 secondes	53 °C	
Extension	20 secondes	72 °C	
Nombre de cycles	42		
Extension finale :	5 minutes	72 °C	

6. Placer les tubes de PCR dans le thermocycleur et démarrer le programme de cycle.
7. Après l'amplification, continuer avec le « **Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)** », page 23.

Les échantillons de PCR peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pour une durée maximale de 3 jours.

Protocole 3 : Immobilisation des produits PCR sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance)

Ce protocole est utilisé pour l'immobilisation de l'ADN matrice sur la sépharose-streptavidine haute performance (GE Healthcare) avant l'analyse sur le système PyroMark Q24.

À effectuer avant de commencer

- Laisser les réactifs et les solutions nécessaires atteindre la température ambiante (entre 15 et 25 °C) avant de commencer.
- Mettre sous tension le PyroMark Q24 au moins 30 minutes avant le début d'une analyse. L'interrupteur d'alimentation se trouve à l'arrière de l'instrument.
- Placer un portoir de plaque PyroMark Q24 sur un bloc chauffant préchauffé à 80 °C. Laisser un second portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante (entre 15 et 25 °C).
- Le tampon de lavage PyroMark est fourni en tant que concentré 10x. Avant de l'utiliser pour la première fois, diluer pour obtenir une solution de travail concentrée 1x en ajoutant 225 mL d'eau ultra-pure à 25 mL de tampon de lavage PyroMark concentré 10x (volume final de 250 mL).

Remarque : la solution de travail tampon de lavage PyroMark concentrée 1x est stable entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

- Préparer la station de travail sous vide PyroMark Q24 pour la préparation des échantillons, tel que décrit dans le Manuel d'utilisation du PyroMark Q24.

Procédure

1. **Agiter doucement le flacon contenant la sépharose-streptavidine haute performance jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.**
2. **Préparer un master mix pour l'immobilisation de l'ADN conformément au tableau 7.**

Préparer un volume supérieur à ce qui est nécessaire pour le nombre total de réactions à effectuer (pour le nombre de réactions + un supplémentaire).

Tableau 7. Master mix pour l'immobilisation de l'ADN

Composant	Volume/échantillon
Tampon de liaison PyroMark	40 µL
Sépharose streptavidine haute performance	1 µL
Eau (H ₂ O, fournie)	29 µL
Volume total	70 µL

Remarque : ce protocole s'applique au Streptavidin Sepharose High Performance avec un numéro de lot 10057037 ou supérieur. En utilisant les billes de sépharose recouverte de streptavidine (Streptavidin Sepharose High Performance) avec un numéro de lot inférieur à 10057037, le volume des billes utilisées par échantillon doit être augmenté à 2 µL, tout en diminuant le volume d'eau de manière correspondante.

- 3. Ajouter 70 µL du master mix aux puits d'une plaque de PCR à 24 puits tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17).**

Les billes de sépharose se déposent rapidement. Maintenir le master mix homogène en mélangeant régulièrement à l'aide d'une pipette ou en le passant à l'agitateur à pulsations multiples. Ne pas isoler le master mix par centrifugation.

- 4. Ajouter 10 µL de produit PCR biotinyllé provenant du Protocole 2 à chaque puits contenant le master mix tel que prédéfini dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 2 : PCR à l'aide des réactifs de PCR fournis avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro », page 20).**

Le volume total par puits doit être de 80 µL après l'ajout du master mix et du produit PCR.

- 5. Sceller la plaque de PCR à l'aide de film adhésif.**

Vérifier qu'aucune fuite entre les puits n'est possible.

- 6. Agiter la plaque de PCR à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes à 1 400 tr/min.**

Pendant ce temps, commencer immédiatement le « Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24 », page 25.

Protocole 4 : Préparation des échantillons avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24

Ce protocole est utilisé pour la préparation de l'ADN simple brin et l'hybridation de l'amorce de séquence à l'ADN matrice avant l'analyse de pyroséquençage sur le PyroMark Q24.

Points importants avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes avec les amorces de séquence, les passer brièvement à la centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Ajouter les 2 amorces de séquences différentes de la même manière que ce qui est prédéfini pour la plaque dans la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17), selon la région de l'analyse (exon 9 du gène *KIT* ou exon 18 du gène *PDGFRA*).
- Ne pas raccourcir le temps de refroidissement des échantillons après le réchauffement à 80 °C.
- Tester régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*, et les remplacer aux échéances indiquées.

Procédure

- 1. Diluer une quantité suffisante de chaque amorce de séquence, Amorce Séq KIT exon 9 et Amorce Séq PDGFRA exon 18, dans le tampon d'hybridation PyroMark tel que décrit dans le tableau 8.**

Préparer un volume d'amorce de séquence diluée supérieur à ce qui est requis pour le nombre total d'échantillons à séquencer (pour le nombre d'échantillons + un supplémentaire).

Ne pas diluer et ne pas stocker davantage d'amorce de séquence.

Tableau 8. Exemple de dilution pour les amorces de séquence

Composant	Volume/ échantillon	Volume pour 9 + 1 réactions
Tampon d'hybridation PyroMark	24,2 µL	242 µL
Amorce Séq KIT exon 9 ou Amorce Séq PDGFRA exon 18	0,8 µL	8 µL
Volume total	25 µL	250 µL

- Ajouter 25 µL d'amorce de séquence diluée à chaque puits de la plaque PyroMark Q24 conformément à la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17).**

Garder l'un des portoirs de plaque PyroMark Q24 (fournis avec la station de travail sous vide PyroMark Q24) à température ambiante (entre 15 et 25 °C) et l'utiliser lors de la préparation et du déplacement de la plaque.

- Mettre sous tension la pompe à vide de la station de travail sous vide PyroMark Q24.**
- Placer la plaque de PCR du Protocole n° 3 et la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide (figure 3).**

Inspecter la plaque de PCR et veiller à ce que les billes de sépharose soient dans la solution. S'assurer que la plaque de PCR est orientée de la même façon que lors du chargement des échantillons.



Figure 3. Placement de la plaque de PCR et de la plaque PyroMark Q24 sur la station de travail sous vide

5. Mettre l'outil sous vide en ouvrant la commande de vide.
6. Plonger lentement les sondes à filtre de l'outil à vide dans la plaque de PCR pour capturer les billes contenant l'ADN matriciel immobilisé. Maintenir les sondes en place pendant 15 secondes. Faire preuve de vigilance lors du retrait de l'outil à vide.

Les billes de sépharose se déposent rapidement. La capture des billes doit se faire immédiatement après l'agitation. S'il s'est écoulé plus d'une minute depuis l'agitation de la plaque, l'agiter à nouveau pendant 1 minute avant de capturer les billes.

Inspecter la plaque de PCR pour vérifier que les échantillons ont été prélevés en totalité par l'outil à vide.

7. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL d'éthanol à 70 % (cuve n° 1, figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 5 secondes.
8. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 40 mL de solution de dénaturation (cuve n° 2, figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 5 secondes.
9. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant 50 mL de tampon de lavage (cuve n° 3, figure 3). Purger les sondes à filtre pendant 10 secondes.
10. Secouer l'outil à vide de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 4).



Figure 4. Illustration de l'outil à vide à plus de 90° par rapport à l'horizontale

- 11. Fermer la commande de vide de l'outil (« Off ») avec l'outil à vide maintenu au-dessus de la plaque PyroMark Q24.**
- 12. Libérer les billes de la plaque PyroMark Q24 en plongeant les sondes à filtre dans l'amorce de séquence diluée et en secouant doucement l'outil à vide latéralement.**

Veiller à ne pas endommager la surface de la plaque PyroMark Q24 en l'éraflant avec les sondes à filtre.
- 13. Transférer l'outil à vide dans la cuve contenant l'eau ultra-pure (cuve n° 4, figure 3) et l'agiter pendant 10 secondes.**
- 14. Laver les sondes à filtre en les plongeant dans l'eau ultra-pure (cuve n° 5, figure 3) et en y appliquant le vide. Purger les sondes avec 70 mL d'eau ultra-pure.**
- 15. Secouer l'outil à vide de haut en bas à plus de 90° par rapport à l'horizontale pendant 5 secondes pour égoutter le liquide présent dans les sondes à filtre (figure 4).**
- 16. Fermer la commande de vide de l'outil (« Off ») et placer l'outil à vide en position de repos (« P »).**
- 17. Éteindre la pompe à vide.**

À la fin de la journée de travail, les déchets liquides et les solutions restantes doivent être rejetés et il convient de vérifier qu'il n'y a pas de poussière et qu'aucun produit ne s'est répandu dans la station de travail sous vide PyroMark Q24. Voir « Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves », page 56.
- 18. Faire chauffer la plaque PyroMark Q24 avec les échantillons à 80 °C pendant 2 minutes à l'aide du portoir de plaque PyroMark Q24 préchauffé.**
- 19. Retirer la plaque PyroMark Q24 du portoir de plaque chaud et la placer pendant 10 à 15 minutes sur un second portoir de plaque PyroMark Q24 laissé à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pour que les échantillons reviennent à température ambiante.**
- 20. Continuer avec le « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 29.**

Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24

Ce protocole décrit la préparation et le chargement des réactifs PyroMark Gold Q24 dans la cartouche PyroMark Q24 ainsi que le démarrage et la fin d'une analyse sur le PyroMark Q24. Pour obtenir une description détaillée de la préparation d'une analyse, voir le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.

Points importants avant de commencer

- Le rapport d'informations de pré-analyse, qui se trouve dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse (voir « Protocole 1 : Configuration de l'analyse pour le système PyroMark Q24 », page 17), fournit des informations relatives au volume des nucléotides et des tampons d'enzyme et de substrat nécessaire pour une analyse spécifique.
- Utiliser des pointes jetables sans filtres hydrophobes pour le chargement de la cartouche afin d'assurer son bon fonctionnement.

Procédure

1. Dissoudre chaque mélange d'enzyme et de substrat lyophilisés respectivement dans 620 µL d'eau (H₂O, fournie).

2. Mélanger le flacon doucement.

Ne pas le passer à l'agitateur !

Pour garantir la dissolution complète du mélange, laisser à température ambiante (entre 15 et 25 °C) pendant 5 à 10 minutes. S'assurer que la solution n'est pas trouble avant de remplir la cartouche PyroMark Q24. S'il n'est pas prévu d'utiliser les réactifs dans l'immédiat, placer les flacons de réactifs sur un lit de glace ou dans un réfrigérateur.

3. Laisser les réactifs et la cartouche PyroMark Q24 atteindre la température ambiante (20 à 25 °C).

4. Placer la cartouche PyroMark Q24 de façon que son étiquette soit orientée vers vous.

5. Charger la cartouche PyroMark Q24 avec les volumes appropriés de nucléotides et de mélanges d'enzymes et de substrats, conformément à la figure 5.

S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est transférée de la pipette vers la cartouche.

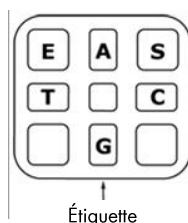


Figure 5. Illustration de la cartouche PyroMark Q24 vue du dessus Les annotations correspondent à l'étiquette sur les flacons de réactifs. Ajouter le mélange d'enzymes (**E**), le mélange de substrats (**S**) et les nucléotides (**A**, **T**, **C**, **G**) en fonction des informations de volume indiquées dans le rapport d'informations de pré-analyse, accessible dans le menu « Tools » (outils) de la configuration de l'analyse.

6. **Ouvrir le support de cartouche et y insérer la cartouche remplie de réactifs avec l'étiquette vers l'extérieur. Pousser la cartouche entière à l'intérieur puis vers le bas.**
7. **S'assurer que la ligne est visible en face de la cartouche puis fermer la porte.**
8. **Ouvrir le dispositif porte-plaques et placer la plaque sur le bloc chauffant.**
9. **Fermer le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
10. **Insérer la clé USB (contenant le fichier d'analyse) dans le port USB sur la face avant de l'instrument.**
Ne pas retirer la clé USB tant que l'analyse n'est pas terminée.
11. **Sélectionner « Run » (analyse) dans le menu principal (à l'aide des boutons ▲ et ▼ de l'écran) puis appuyer sur « OK ».**
12. **Sélectionner le fichier d'analyse à l'aide des boutons ▲ et ▼ de l'écran.**
pour visualiser le contenu d'un dossier, sélectionner le dossier puis appuyer sur « Select » (sélectionner). Pour retourner à la page précédente, appuyer sur « Back » (retour).
13. **Lorsque le fichier d'analyse est sélectionné, appuyer sur « Select » (sélectionner) pour démarrer l'analyse.**
14. **Lorsque l'analyse est terminée et que l'instrument confirme que le fichier d'analyse a été enregistré sur la clé USB, appuyer sur « Close » (fermer).**
15. **Retirer la clé USB.**
16. **Ouvrir le couvercle de l'instrument.**
17. **Ouvrir la porte de la cartouche et sortir la cartouche de réactifs en la soulevant puis en la tirant vers l'extérieur.**
18. **Fermer la porte.**
19. **Ouvrir le dispositif porte-plaques et retirer la plaque du bloc chauffant.**
20. **Fermer le dispositif porte-plaques et le couvercle de l'instrument.**
21. **Jeter la plaque et nettoyer la cartouche conformément aux instructions de la fiche produit fournie avec la cartouche.**
22. **Analyser le test conformément au « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31.**

Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24

Ce protocole décrit l'analyse de la mutation d'un test GIST RapidScreen terminé à l'aide du logiciel PyroMark Q24.

Procédure

1. Insérer la clé USB contenant le fichier de l'analyse effectuée dans le port USB de l'ordinateur.
2. Déplacer le fichier d'analyse depuis la clé USB vers l'endroit souhaité sur l'ordinateur à l'aide de Windows Explorer.
3. Ouvrir 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. Il existe 2 méthodes pour analyser le test. En cas d'utilisation du GIST RapidScreen Plug-in Report, aller à l'étape 5. En cas d'utilisation de l'analyse de la quantification des allèles intégrée au logiciel PyroMark Q24, aller à l'étape 6.

Remarque : il est vivement conseillé d'utiliser le GIST RapidScreen Plug-in Report pour la documentation et l'interprétation des résultats. Il est possible d'obtenir le GIST RapidScreen Plug-in Report par e-mail en écrivant à l'adresse pyro.plugin@qiagen.com. Ce rapport garantit que les valeurs de LoD respectives (tableau 9) et les différentes fonctions « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) sont utilisées pour détecter automatiquement toutes les mutations.

Remarque : deux mutations complexes au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* (2526_2538>G et 2524_2526 GAC>TAT) ne peuvent pas être analysées avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24. Nous recommandons d'utiliser le GIST RapidScreen Plug-in Report pour l'analyse des mutations complexes de l'exon 18 du gène *PDGFRA*.

5. Utilisation du GIST RapidScreen Plug-in Report : pour générer un rapport, sélectionner « AQ Add On Reports/GIST » (rapports de l'option quantification des allèles/GIST) à partir de « Reports » (rapports) dans le menu (voir figure 6).

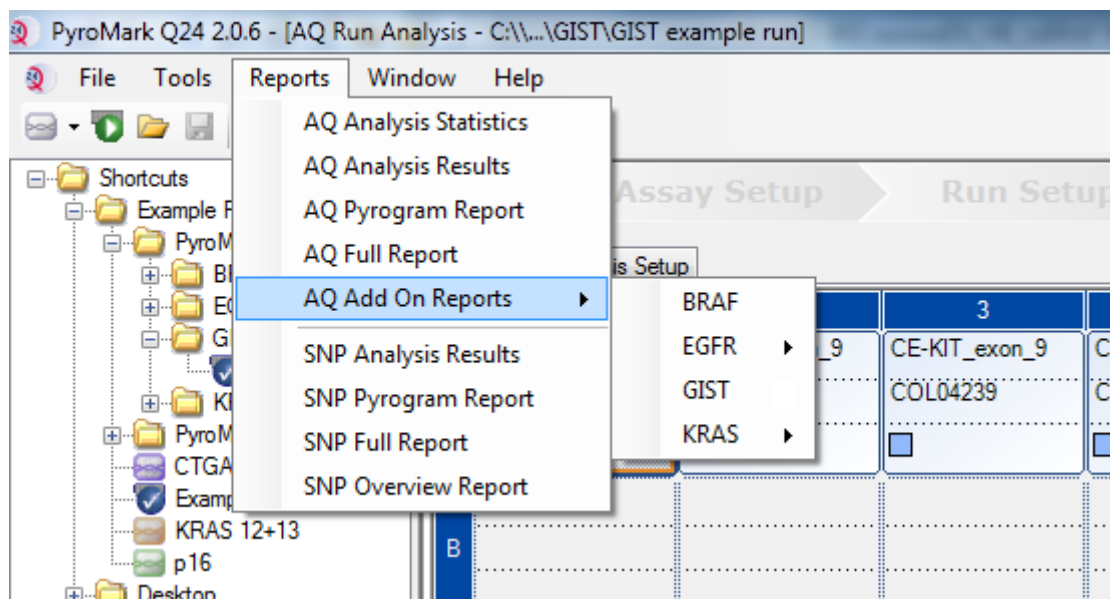


Figure 6. Menu permettant d'accéder au GIST RapidScreen Plug-in Report.

Les puits seront automatiquement analysés afin de détecter toutes les mutations pour lesquelles la LoD est fournie dans le tableau 9. Les résultats seront présentés dans un tableau récapitulatif (voir figure 7), suivi des résultats détaillés, qui incluent les pyrogrammes et la qualité de l'analyse.

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.

Figure 7. GIST RapidScreen Plug-in Report.

- Utilisation de l'analyse de quantification des allèles :
Pour analyser le test et obtenir un aperçu des résultats, cliquer sur l'un des boutons « Analyze ».



Analyser tous les puits.



Analyser le puits sélectionné.

Les résultats de l'analyse (fréquences des allèles) et l'évaluation de la qualité sont affichés au-dessus de la position de la variable sur le tracé de Pyrogram[®]. Pour plus d'informations concernant la façon d'analyser un test, voir le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.

Pour générer un rapport, sélectionner « AQ Full Report » (rapport complet de quantification des allèles) ou « AQ Analysis Results » (résultats de l'analyse de quantification des allèles) dans le menu « Reports » (rapports).

Remarque : pour des résultats fiables, nous recommandons des hauteurs de pics mononucléotidiques supérieures à 30 RLU. Le paramètre « required peak height for passed quality » (hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) doit être réglé sur 30 RLU dans la configuration du test (voir « Annexe A : Préparation des tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro », et le *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*).

Remarque : le rapport « AQ Analysis Results » (résultats de l'analyse de quantification des allèles) doit être utilisé pour documenter et interpréter la quantification des allèles. Les nombres apparaissant dans le pyrogramme sont arrondis et ne représentent pas la quantification exacte.

Remarque : le tracé de pyrogramme doit systématiquement être comparé à l'histogramme, qui peut être affiché par un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Les pics mesurés doivent avoir la même hauteur que les barres d'histogramme.

Réanalyse des échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to analyze » (séquence à analyser), ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec).

La fonction « Sequence to Analyze » standard définie dans la configuration d'analyse concerne la duplication de 6 pb au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* et la mutation ponctuelle la plus fréquente au niveau du codon 842 (GAC>GTC) de l'exon 18 du gène *PDFGRA* (voir l'Annexe A, page 52). Si un échantillon contient une mutation moins fréquente au niveau de l'exon 18 du gène *PDFGRA*, la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) peut être modifiée pour analyser le statut mutationnel de cette mutation, tel que décrit dans l'Annexe A.

Deux mutations complexes au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* (2526_2538>G et 2524_2526GAC>TAT) ne peuvent pas être analysées avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24. Nous recommandons d'utiliser le GIST RapidScreen Plug-in Report pour l'analyse des mutations complexes de l'exon 18 du gène *PDGFRA*.

Nous recommandons fortement de réanalyser tous les échantillons sans mutations détectées avec la fonction standard « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), ainsi que les échantillons dont l'évaluation de la qualité a été marquée d'un « Check » (à vérifier) ou d'un « Failed » (échec). Les évaluations de qualité « Check » (à vérifier) et « Failed » (échec) peuvent indiquer une mutation rare qui n'est pas analysée par la fonction « Sequence to Analyze » standard, donnant lieu à des valeurs maximales de référence inattendues.

Pour réanalyser et cibler les mutations moins fréquentes, accéder à « Analysis Setup » (configuration d'analyse) et modifier « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) avec les variantes décrites à l'Annexe A ou les variantes d'autres mutations rares ou inattendues. Cliquer sur « Apply » (appliquer), puis sur « To All » (à tous) lorsque la fenêtre « Apply Analysis setup » (appliquer la configuration de l'analyse) apparaît.

Les fréquences de mutations mises à jour dans le gène *KIT/PDGFRA* humain sont fournies en ligne par le Sanger Institute sur le site www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

Remarque : après avoir modifié la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser), s'assurer que le seuil de la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU.

Remarque : des mutations rares ou inattendues peuvent être présentes dans la région séquencée et peuvent être analysées à l'aide d'une autre fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) en prenant en compte les mutations inattendues.

Remarque : 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 le statut mutationnel. Il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Interprétation des résultats

Interprétation des résultats d'analyse et détection des mutations de faible niveau

Il est fortement recommandé d'inclure un ADN témoin non méthylé dans chaque analyse à des fins de comparaison et en tant que témoin pour le bruit de fond. La fréquence mesurée pour l'échantillon témoin doit être inférieure ou égale à la limite du blanc (LoB). Les valeurs de LoB (limite du blanc) et de LoD (limite de détection) indiquées dans les manuels peuvent être utilisées pour déterminer la présence d'une mutation. Ces valeurs ont été obtenues en utilisant des mélanges de plasmides porteurs du type sauvage ou de la séquence mutée correspondante.

Après analyse à l'aide du logiciel PyroMark Q24 ou des Plug-in Reports, trois résultats sont possibles.

- Fréquence de mutation $< \text{LoD}$: Mutation non détectée
- Fréquence de mutation $> \text{LoD} + 3 \text{ unités } \%$: mutation
- Fréquence de mutation $\geq \text{LoD}$ et $\leq \text{LoD} + 3 \text{ unités } \%$: mutation de faible niveau potentielle

Remarque : en cas d'utilisation du GIST RapidScreen Plug-in Report (voir l'étape 5 de la section « Protocole 6 : Analyse d'un test PyroMark Q24 », page 31), un avertissement sera diffusé si cela se produit.

La fourchette comprise entre la LoD et la LoD + 3 unités % permet la détection sensible de mutations de faible niveau dans des conditions optimales. Une fréquence mesurée supérieure à la LoB dans l'échantillon témoin non méthylé 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. Les résultats accompagnés d'un avertissement « Mutation de faible niveau potentielle » doivent être évalués attentivement.

Les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle a été rapportée ne doivent être considérés positifs pour cette mutation que si ce résultat est confirmé lors d'une nouvelle analyse en duplicat avec de l'ADN témoin non méthylé. Les résultats des deux duplicats devraient détecter la même mutation avec des valeurs $\geq \text{LoD}$, et l'échantillon témoin devrait rapporter « Pas de mutation détectée ». Dans le cas contraire, l'échantillon doit être considéré comme « Pas de mutation détectée ».

Une augmentation du bruit de fond pour une mutation peut être détectée en comparant les valeurs de LoB figurant dans le manuel aux mesures obtenues

avec l'ADN témoin non méthylé. Les échantillons pour lesquels une mutation de faible niveau potentielle est détectée peuvent être considérés comme « Mutation non détectée » sans nouvelle analyse si la fréquence mesurée pour l'ADN témoin non méthylé est supérieure à la valeur de la LoB indiquée dans le manuel pour la mutation correspondante. Trois scénarios différents sont donc possibles lorsque des mutations de faible niveau potentielles sont rapportées.

1. Fréquence mesurée avec l'ADN témoin non méthylé > LoB pour cette mutation : l'échantillon peut être considéré comme « Mutation non détectée » sans nouvelle analyse.
2. Reproduit en duplicat avec un résultat différent : l'échantillon est considéré comme « Mutation non détectée ».
3. Reproduit en duplicat avec le même résultat et échantillon de type sauvage < LoB pour la mutation correspondante : mutation détectée

Remarque : le tracé de pyrogramme doit systématiquement être comparé à l'histogramme, qui peut être affiché par un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Les pics mesurés doivent avoir la même hauteur que les barres d'histogramme. La présence de pics inattendus sur les tracés de pyrogramme 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, il est recommandé de réanalyser l'échantillon. La détermination du statut mutationnel ne doit jamais reposer sur des résultats qui semblent caractéristiques d'un échec. Pour qu'une mutation soit valide, une variation de la hauteur d'un pic est toujours associée à une variation correspondante de hauteur pour un autre pic. Une variation de hauteur affectant un seul pic ne doit pas être considérée comme indicative d'une mutation.

Remarque : il est recommandé d'utiliser le GIST RapidScreen Plug-in Report pour l'interprétation des résultats. 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 de l'application (p. ex., pour comparaison avec la fréquence mutationnelle de l'échantillon témoin).

Remarque : une décision relative au traitement des patients atteints de cancer ne doit pas s'appuyer uniquement sur le statut mutationnel de l'exon 9 du gène *KIT* et de l'exon 18 du gène *PDGFRA*.

Tableau 9. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V58)
Exon 9 du gène <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Exon 18 du gène <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ou [‡]	D842_H845del ou [‡]	2,2	5,2	737
2526_2537del12	I843_D846del [‡]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	6,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9	12406
2526_2538>G [§]	D842_D846>E	0,3	3,3	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9	12397

* 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/.

[†] Les mutations 2524G>T et 2524_2526GAC>TAT, et 2526_2537del12 et 2527_2538del12, respectivement, engendrent le même changement d'acide aminé.

[‡] Les mutations 2524_2535del12 et 2526_2537del12 engendrent le même changement d'acide nucléique.

[§] Les mutations 2526_2538>G et 2524_2526GAC>TAT ne peuvent pas être analysées dans le mode quantification des allèles du logiciel PyroMark Q24.

Résultats représentatifs

Les résultats représentatifs de Pyrogram sont présentés dans les figures 8 à 11.

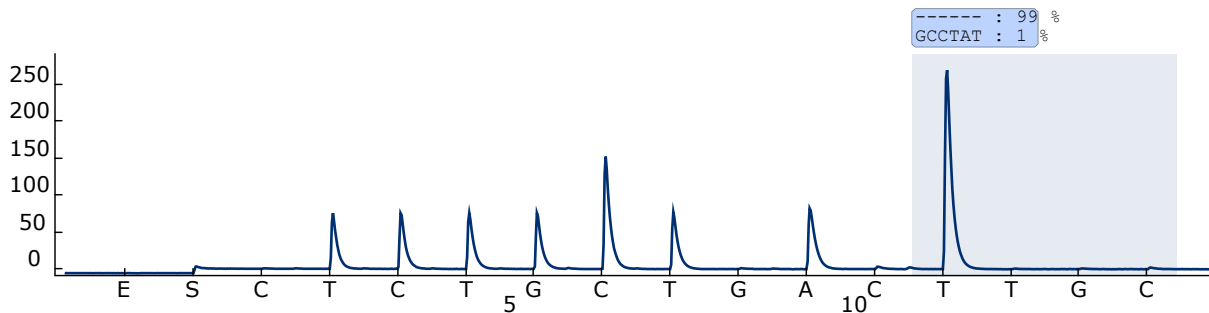


Figure 8. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* avec la séquence à analyser (« Sequence to analyze ») *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA* concernant la duplication de 6 pb après le codon 503.

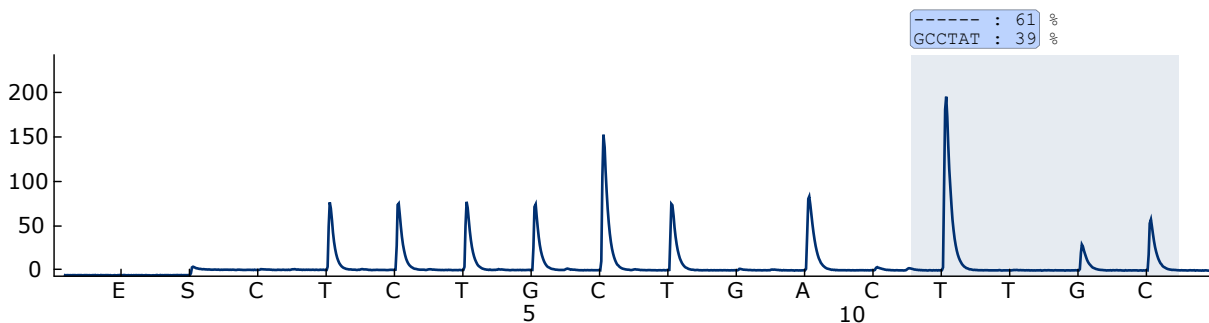


Figure 9. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon avec duplication de GCCTAT après le codon 503 dans l'exon 9 du gène *KIT* avec la fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser) *TCTGCCTAT[GCCTAT]TTTA*.

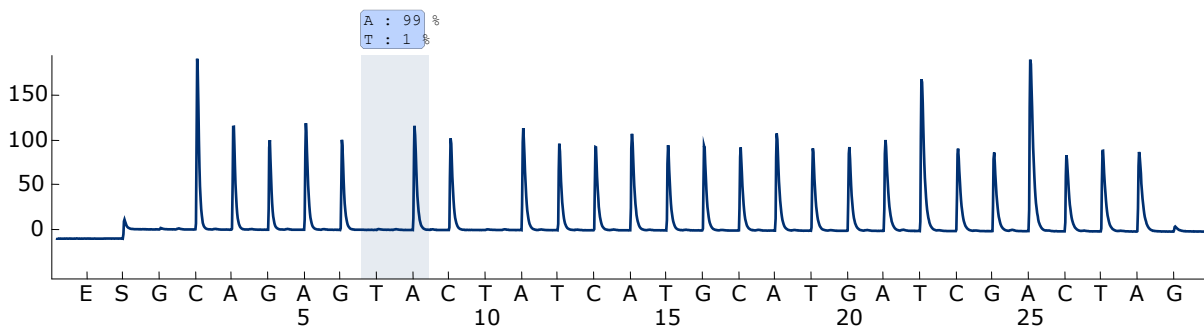


Figure 10. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant un génotype sauvage au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* avec la séquence à analyser (« Sequence to analyze ») *CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT* concernant la mutation GAC>GTC au niveau du codon 842 (nucléotide 2525).

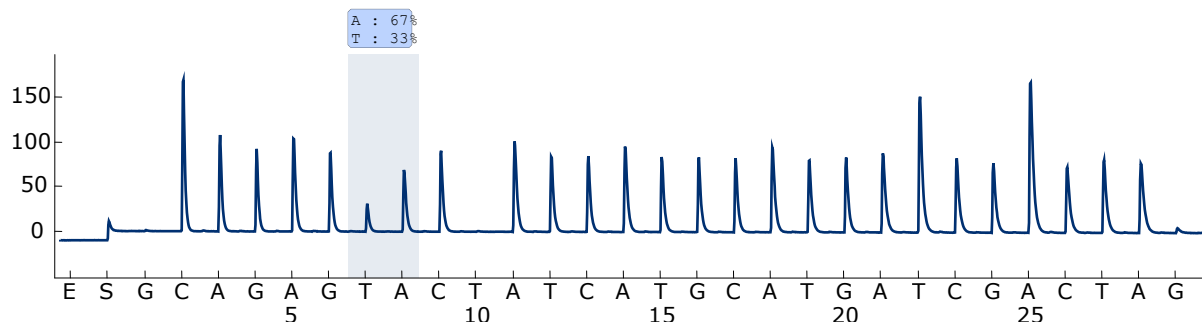


Figure 11. Tracé de pyrogramme obtenu après analyse d'un échantillon présentant une mutation GAC>GTC au niveau du codon 842 (nucléotide 2525) dans l'exon 18 du gène *PDGFRA* à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) CCAGAGWCATCATGCATGATTCGAACTAT.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de foire aux questions dans notre Centre de support technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les techniciens de QIAGEN sont toujours heureux de répondre aux questions concernant les informations et les protocoles contenus dans ce manuel ou à propos des technologies d'échantillonnage et de dosage (pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Se reporter au *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24* pour des informations générales concernant le dépannage de l'instrument.

Commentaires et suggestions

Signaux du témoin négatif

- | | |
|---------------------------------|---|
| a) Interférence entre les puits | Le signal d'un puits est détecté par un puits voisin. Éviter de placer des échantillons présentant des intensités de signal élevées près de puits de témoin négatif. |
| b) Contamination PCR | Utiliser des pointes de pipette stériles avec filtres. Stocker et extraire les substances telles que les prélèvements, les témoins et les amplicons séparément des réactifs de PCR. |

Commentaires et suggestions

Séquence pauvre ou inattendue

ADN génomique de mauvaise qualité

L'ADN génomique de mauvaise qualité peut provoquer un échec de la PCR. Analyser les échantillons de PCR à l'aide d'une technique électrophorétique (par exemple, le système QIAxcel® ou l'électrophorèse sur gel d'agarose).

Résultat « Check » (à vérifier) ou « Failed » (échec)

a) Faible hauteur de pic

Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR ou de la préparation des échantillons avant le pyroséquençage peuvent entraîner de faibles pics.

Il est important que les échantillons soient prélevés en totalité par l'outil à vide. Veiller à plonger lentement l'outil à vide dans les échantillons et s'assurer que la géométrie de la plaque (ou les barrettes) de PCR utilisée pour l'immobilisation permette de prélever la totalité des échantillons.

Tester régulièrement le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le *Manuel du PyroMark Q24*, et les remplacer aux échéances indiquées.

En cas d'avertissement marqué d'un « Check » (à vérifier), comparer attentivement le tracé de pyrogramme et l'histogramme, affichable en faisant un clic droit dans la fenêtre Pyrogram. Si les pics mesurés concordent avec la hauteur des barres d'histogramme, le résultat est valide. Dans le cas contraire, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

b) Mutation non définie dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser)

Ajuster la séquence à analyser « Sequence to Analyze » dans la configuration du test (voir « Annexe A : Préparation des tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro », page 52) et effectuer une réanalyse.

Commentaires et suggestions

- c) Mutation inattendue rare
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 la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) fournie. Ces échantillons doivent être analysés à l'aide de la fonction « Sequences to Analyze » (séquences à analyser) alternative en raison des mutations inattendues.
- d) Avertissement relatif à une déviation de la hauteur de pic maximal au niveau d'une distribution
Le tracé de pyrogramme doit être comparé attentivement à l'histogramme, affichable à l'aide d'un clic droit dans la fenêtre Pyrogram (pyrogramme). Si les pics mesurés ne concordent pas avec la hauteur des barres d'histogramme et qu'une mutation rare ne permet pas d'expliquer ce phénomène, il est recommandé de réanalyser l'échantillon.

Bruit de fond élevé

- a) Stockage des nucléotides incorrect
Stocker les nucléotides entre 2 et 8 °C. Le stockage entre -15 et -30 °C peut provoquer une augmentation du bruit de fond.
- b) Temps de refroidissement des échantillons trop court avant l'analyse de pyroséquençage
Laisser les échantillons sur un portoir de plaque PyroMark Q24 à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Ne pas raccourcir le temps de refroidissement.
- c) Contamination de la cartouche
Nettoyer soigneusement la cartouche, comme indiqué dans la fiche produit. Conserver la cartouche à l'abri de la lumière et de la poussière.

Commentaires et suggestions

Aucun signal pour le témoin positif (ADN témoin non méthylé)

- | | |
|--|---|
| a) Mélange d'enzymes ou de substrats insuffisant pour tous les puits | S'assurer de bien remplir la cartouche PyroMark Q24 conformément aux « Pre Run Information » (informations de pré-analyse) du menu « Tools » (outils). |
| b) Réactifs stockés ou dilués de manière incorrecte | Préparer les réactifs conformément aux instructions fournies à la section « Protocole 5 : Mettre sous tension le PyroMark Q24 », page 29. |
| c) Échec de la PCR ou de la préparation de l'échantillon | Des erreurs de manipulation lors de la configuration de la PCR, de la programmation de l'instrument de PCR ou de la préparation des échantillons avant le pyroséquençage peuvent entraîner une absence de signal. Tester le fonctionnement des sondes à filtre, tel que décrit dans le <i>Manuel du PyroMark Q24</i> , et les remplacer si nécessaire. Recommencer la PCR et l'analyse de pyroséquençage. |

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot de kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Limitations

Tous les résultats de diagnostic générés doivent être interprétés en tenant compte d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

Pour obtenir des résultats de PCR optimaux, se conformer au manuel de l'utilisateur de manière rigoureuse. Il est important de respecter les dates de péremption imprimées sur les boîtes et les étiquettes de tous les composants. Ne pas utiliser de composants périmés.

Caractéristiques des performances

Limite du blanc et limite de détection

La limite du blanc (LoB) et la limite de détection (LoD) ont été déterminées pour un certain nombre de mutations à l'aide de mélanges de plasmides (Tableau 10). LoB et LoD ont été déterminées conformément aux recommandations du protocole EP17-A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) « Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline ». Les erreurs α et β (respectivement faux positif et faux négatif) ont été définies à 5 %. La LoD de certaines délétions rares au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* a été déterminée en ajoutant 3 écarts types de mesures de blanc à la valeur de LoB. Les valeurs de la LoD ont été définies au moins à 3 unités % au-dessus de la valeur de LoB.

Les valeurs de la LoB représentent la fréquence mesurée obtenue avec un échantillon de type sauvage. Les valeurs de la LoD représentent le signal le plus bas (fréquence mesurée) qui peut être considéré comme positif pour la mutation correspondante.

Tableau 10. LoB et LoD déterminées pour des mutations spécifiques

Substitution d'acide nucléique	Substitution d'un acide aminé	LoB (unités %)	LoD (unités %)	ID COSMIC* (V58)
Exon 9 du gène <i>KIT</i>				
1509_1510insGCCTAT	Y503_F504insAY	1,9	4,9	1326
Exon 18 du gène <i>PDGFRA</i>				
2525A>T	D842V	0,6	3,6	736
2524G>T	D842Y [†]	0,6	3,6	12396
2524_2535del12 ou [‡]	D842_H845del ou [‡]	2,2	5,2	737
2526_2537del12	I843_D846del [†]			96892
2527_2538del12	I843_D846del [†]	3,0	5,0	12400
2528_2539del12	I843_S847>T	4,2	7,2	12407
2530_2541del12	M844_S847del	3,2	6,2 [§]	12402
2524_2532del9	D842_M844del	1,5	4,5	12401
2524_2526delGAC	D842del	0,9	3,9 [§]	12406
2526_2538>G [¶]	D842_D846>E	0,3	3,3 [§]	12408
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	0,9	3,9 [§]	12397

* 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/.

[†] Les mutations 2524G>T et 2524_2526GAC>TAT, et 2526_2537del12 et 2527_2538del12, respectivement, engendrent le même changement d'acide aminé.

[‡] Les mutations 2524_2535del12 et 2526_2537del12 engendrent le même changement d'acide nucléique.

[§] La LoD de certaines délétions rares au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* a été déterminée en ajoutant 3 écarts types de mesures de blanc à la valeur de LoB.

[¶] La mutation 2526_2538>G ne peut pas être analysée avec l'analyse de quantification des allèles dans le logiciel PyroMark Q24.

Linéarité

La linéarité a été déterminée à l'aide de mélanges de plasmides porteurs de la séquence sauvage ou mutante pour la duplication 1509_1510insGCCTAT au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* et la mutation 2525A>T au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA*. Les plasmides ont été mélangés dans des proportions permettant d'obtenir 4 niveaux de mutation (5, 10, 30 et 50 %). Chaque mélange a été analysé avec 3 lots différents du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro, lors de 3 analyses de pyroséquençage portant chacune sur 3 réplicats.

Les résultats (n = 9 pour chaque niveau de mutation) ont été analysés conformément au protocole EP6-A du CLSI « Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline », avec le logiciel Analyse-it® v2.21. Ces résultats sont illustrés dans les figures 12 et 13.

Les résultats étaient linéaires, avec une non-linéarité autorisée de 5 unités % dans l'intervalle testé de 5 à 50 % de niveau de mutation.

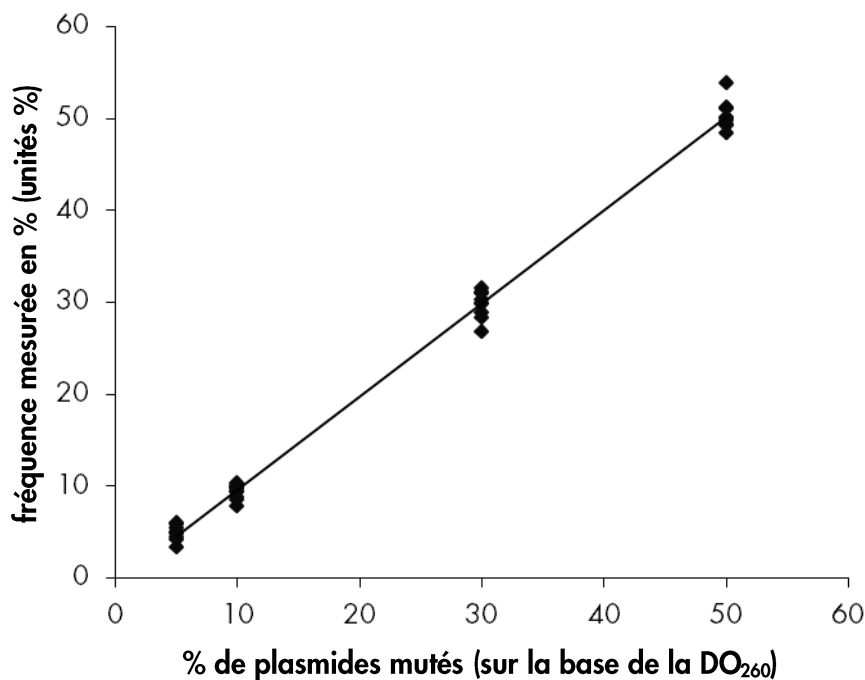


Figure 12. Linéarité de la duplication 1509_1510insGCCTAT au niveau de l'exon 9 du gène *KIT*.

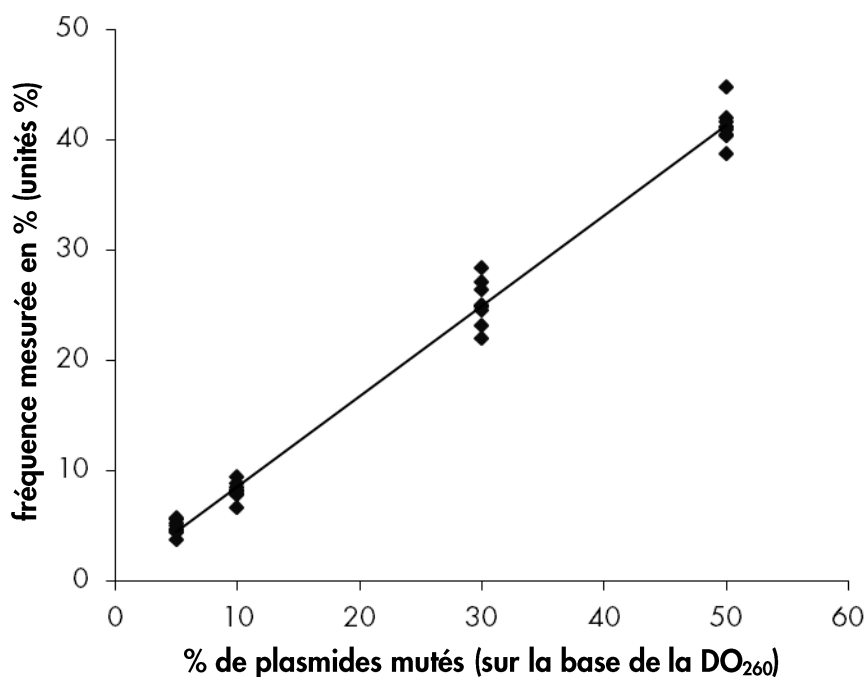


Figure 13. Linéarité de la mutation 2525A>T au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA*.

Précision

Les données de précision permettent de déterminer la variabilité totale des tests. Elles ont été obtenues pour 3 niveaux différents, par analyse des mélanges de plasmides susmentionnés, avec 3 réplicats chacune.

La répétabilité (variabilité intratest et interlot) a été calculée sur la base des données utilisées pour déterminer la linéarité (3 analyses réalisées le même jour avec divers lots du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro). La précision moyenne (variabilité intralaboratoire) a été déterminée lors de 3 analyses réalisées dans un seul laboratoire, 3 jours différents, par des opérateurs, sur des instruments PyroMark Q24 et avec des lots du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro variables. La reproductibilité (variabilité interlaboratoire) a été calculée à partir de 2 analyses réalisées chacune dans un laboratoire interne et dans un laboratoire externe, avec divers lots du kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro.

Les estimations de la précision sont exprimées en tant qu'écart type des fréquences de mutation mesurées, en unités % (tableau 11). La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité de la duplication 1509_1510insGCCTAT au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* étaient respectivement de 0,8–1,6, 0,5–1,5 et 0,7–1,9 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de mutation compris entre 5 et 50 %. La répétabilité, la précision moyenne et la reproductibilité de la mutation 2525A>T au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA* étaient

respectivement de 0,6–1,9, 0,6–3,7 et 0,5–2,4 unités %, dans les limites mesurées d'un niveau de mutation compris entre 5 et 50 %.

Tableau 11. Précision pour la duplication 1509_1510insGCCTAT au niveau de l'exon 9 du gène *KIT**

% de plasmides mutés [†]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.
5	4,9	0,8	4,6	0,5	4,6	0,7
10	9,3	0,8	9,3	1,2	9,3	0,9
30	29,7	1,5	29,2	1,2	29,2	1,7
50	50,3	1,6	50,2	1,5	49,7	1,9

* Toutes les valeurs sont exprimées en unités %. É.T. : écart type (n = 9).

† Fondé sur la mesure DO₂₆₀.

Tableau 12. Précision pour la mutation 2525A>T au niveau de l'exon 18 du gène *PDGFRA*[‡]

% de plasmides mutés [§]	Répétabilité		Précision moyenne		Reproductibilité	
	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.	Moy.	É.T.
5	4,8	0,6	4,8	0,6	5,0	0,5
10	8,2	0,8	7,7	0,7	8,8	1,0
30	25,1	1,9	23,6	3,4	26,6	1,4
50	41,2	1,6	40,5	3,7	43,3	2,4

‡ Toutes les valeurs sont exprimées en unités %. É.T. : écart type (n = 9).

§ Basé sur la mesure OD₂₆₀.

Évaluation diagnostique

Le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro a été évalué par comparaison au séquençage Sanger. L'ADN a été extrait de 100 échantillons de tumeurs GIST fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE) et analysé à la recherche de mutations au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* et de l'exon 18 du gène *PDGFRA*.

L'ADN a été isolé à l'aide du kit QIAamp DNA FFPE Tissue. Les analyses ont été réalisées avec le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro sur le PyroMark Q24. Le séquençage Sanger a été réalisé sur l'Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer.

Sur les 100 échantillons analysés, le statut mutationnel a pu être déterminé systématiquement pour l'exon 9 du gène *KIT* (figure 13) et pour l'exon 18 du gène *PDGFRA* (figure 14) avec les deux méthodes.

Tableau 13. Résultats des échantillons de tumeurs GIST analysés pour l'exon 9 du gène *KIT*

Exon 9 du gène <i>KIT</i>		Séquençage Sanger		
		Pas de mutation détectée	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	Total
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Pas de mutation détectée	92	0	92
	1509_1510insGCCTAT Y503_F504insAY	0	8	8
	Total	92	8	100

Tableau 14. Résultats des échantillons de tumeurs GIST analysés pour l'exon 18 du gène *PDGFRA*

Exon 18 du gène <i>PDGFRA</i>		Séquençage Sanger				Total
		Type sauvage	2530-2541del12 M844_S847del	2526-2538>G D842_D846>E	2525A>T D842V	
Kit <i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro	Pas de mutation détectée	92	0	0	0	92
	2530-2541del12 M844_S847del	0	2	0	0	2
	2526-2538>G D842_D846>E	0	0	3	0	3
	2525A>T D842V	1	0	0	2	3
	Total	93	2	3	2	100

Remarque : lors de toutes les analyses utilisées pour obtenir des informations sur les performances, le signal était supérieur à 30 RLU, comme cela est systématiquement le cas pour l'analyse de 10 ng d'ADN isolé de tissus fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine (FFPE). Les données de pyroséquençage ont été analysées à l'aide du GIST RapidScreen Plug-in Report.

Références

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

Pour une liste complète des références, visiter notre base 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 votre distributeur local.

Références citées

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group (2012) Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23** (Supplement 7), vii49.
2. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST) (2010) Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis of 1,640 patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1247.
3. Joensuu, H. (2006) Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann. Oncol.* **17** (Supplement 10), x280.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l’emballage et l’étiquetage :



<N>

Contient des réactifs pour <N> tests



À utiliser avant



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Numéro de référence



Numéro de lot



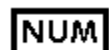
Numéro de matériel



Composants



Contient



Nombre



Code article international (GTIN)



Limite de température



Fabricant



Consulter les instructions d'utilisation



Avertissement

Coordonnées

Pour obtenir une assistance technique et plus d'informations, prière de consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support, de téléphoner au 00800-22-44-6000 ou de contacter l'un des services techniques de QIAGEN ou l'un des distributeurs locaux (voir quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Annexe A : Préparation des tests *therascreen* GIST RapidScreen Pyro


Si le GIST RapidScreen Plug-in Report a été installé, des configurations de test prédéfinies pour l'exon 9 du gène *KIT* et l'exon 18 du gène *PDGFRA* sont disponibles dans le raccourci du navigateur du logiciel PyroMark Q24, sous « Example Files/PyroMark Setups/GIST ». Les étapes suivantes n'ont pas besoin d'être effectuées. Il est possible de se procurer le GIST RapidScreen Plug-in Report sur le site pyro.plugin@qiagen.com.

Nous recommandons vivement l'utilisation du GIST RapidScreen Plug-in Report plutôt que de l'analyse manuelle. Les mutations complexes de l'exon 18 du gène *PDGFRA* ne peuvent pas être ajoutées manuellement à une fonction « Sequence to Analyze ». Elles doivent être analysées à l'aide du GIST RapidScreen Plug-in Report. Une fois l'extension installée ou bien chaque fois qu'un nouveau logiciel est installé ou mis à niveau sur l'ordinateur de bureau, il est nécessaire de vérifier que l'extension fonctionne correctement conformément au Guide rapide de l'extension (GIST RapidScreen Plug-In Quick Guide).

Si le GIST RapidScreen Plug-in Report n'a pas été installé, les fichiers de test doivent être configurés manuellement avant les premières analyses du test *therascreen* GIST RapidScreen Pyro. Configurer le test de l'exon 9 du gène *KIT* et de l'exon 18 du gène *PDGFRA* à l'aide du logiciel PyroMark Q24, tel que décrit ci-dessous.

Procédure

Exon 9 du gène *KIT*

- A1.** Cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).
- A2.** Saisir manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
CTCTGCTGACTTGC
- A3.** Entrer la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) :
TCTGCCTAT[GCCTAT]TTAA

La duplication de 6 pb GCCTAT après le codon 503 au niveau de l'exon 9 du gène *KIT* sera détectée à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

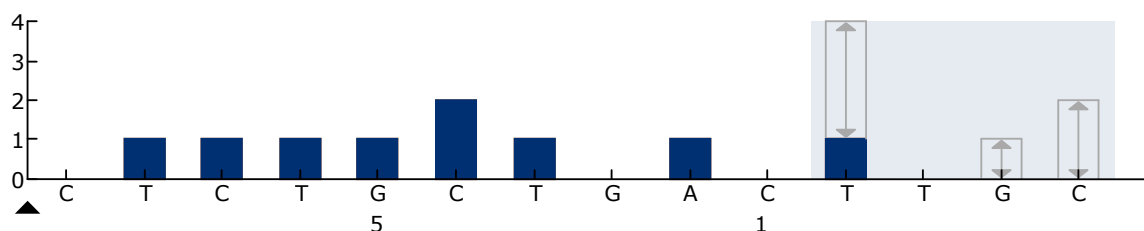




Figure 14. Histogramme de l'exon 9 du gène *KIT* avec la séquence à analyser (« Sequence to analyze ») TCTGCCTAT[GCCTAT]TTA concernant la duplication de 6 pb après le codon 503.

- A4. Cliquer sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmenter la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.
- A5. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sauvegarder le test sous le nom « KIT exon 9 »

Exon 18 du gène *PDGFRA*

- A1. Cliquer sur  dans la barre d'outils puis sélectionner « New AQ Assay » (nouveau test de quantification des allèles).
- A2. Ajouter manuellement l'ordre de distribution (« Dispensation Order ») suivant :
GCAGAGTACTATCATGCATGATCGACTAG
- A3. Entrer la séquence suivante dans « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) :
CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT

La mutation la plus fréquente GAC>GTC dans le codon 842 (nucléotide 2525) de l'exon 18 du gène *PDGFRA* sera détectée à l'aide de la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser).

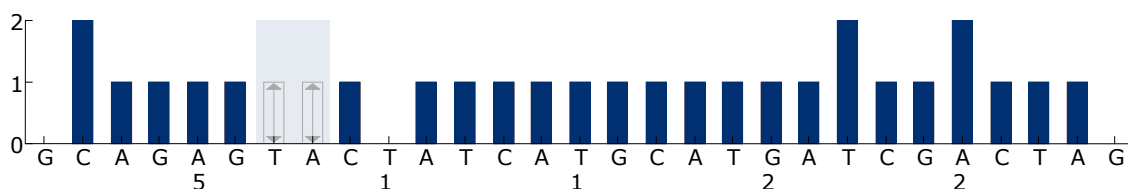


Figure 15. Histogramme de l'exon 18 du gène *PDGFRA* avec la séquence à analyser (« Sequence to analyze ») CCAGAGWCATCATGCATGATTCTGAACTAT concernant la mutation GAC>GTC au niveau du codon 842 (nucléotide 2525).

La fonction « Sequence to Analyze » peut être modifiée après l'analyse afin d'analyser également les mutations au niveau du nucléotide 2524 (codon 842) de même que 9 délétions et mutations complexes dans la région des codons 842 à 847.

Pour vérifier si les mutations sont présentes, modifier la fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) comme indiqué au tableau 15.

Remarque : lors de la configuration de test, le message d'avertissement suivant peut être ignoré : « Quantification may be uncertain: the variable position requires more than 5 dispensations » (Risque d'incertitude de la quantification : la position de la variable exige plus de 5 distributions).

Remarque : vérifier que le seuil pour la hauteur de pic mononucléotidique est réglé sur 30 RLU.


- A4. Cliquer sur l'onglet « Analysis Parameters » (paramètres de l'analyse) et augmenter la valeur du champ « Peak Height Threshold - Required peak height for Passed Quality: » (seuil de hauteur de pic - hauteur de pic requise pour la validation de la qualité) jusqu'à 30.**
- A5. Cliquer sur  dans la barre d'outils et sauvegarder le test sous le nom « PDGFRA exon 18 »**

Tableau 15. Principales mutations détectées par le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro à l'aide d'une autre fonction « Sequence to Analyze » (séquence à analyser)

Modification d'acide nucléique	Modification d'acide aminé	« Sequence to Analyze »
Exon 9 du gène <i>KIT</i>		
1509_1510 insGCCTAT	Y503_F504insAY	TCTGCCTAT[GCCTAT] TTTAA*
Exon 18 du gène <i>PDGFRA</i>		
2525A>T	D842V	CCAGAGWCATCATGC ATGATTCGAACTAT*
2524G>T	D842Y [†]	CCAGAKACATCATGCAT GATTCGAACTAT
2524_2535del12 ou [‡] 2526_2537del12	D842_H845del ou [‡] I843_D846del [†]	CCAGAGA[CATCATGC ATGA]TTCGAACTAT
2527_2538del12	I843_D846del [†]	CCAGAGAC[ATCATGC ATGAT]TCGAACTAT
2528_2539del12	I843_S847>T	CCAGAGACA[TCATGC ATGATT]CGAACTAT
2530_2541del12	M844_S847del	CCAGAGACATC [ATGCATGATTCG] AACTATGTGT
2524_2532del9	D842_M844del	CCAGA[GACATCATG] CATGATTCGAACTAT
2524_2526delGAC	D842del	CCAGA[GAC]ATCATG CATGATTCGAACTAT
2526_2538>G	D842_D846>E	— [§]
2524_2526GAC>TAT	D842Y [†]	— [§]


* « Sequence to Analyze » (séquence à analyser) standard.

[†] Les mutations 2524G>T et 2524_2526GAC>TAT, et 2526_2537del12 et 2527_2538del12, respectivement, engendrent la même substitution d'acide aminé.

[‡] Les mutations 2524_2535del12 et 2526_2537del12 entraînent la même substitution d'acide nucléique et sont analysées à l'aide de la même fonction « Sequence to analyze » (séquence à analyser).

[§] Les mutations 2526_2538>G et 2524_2526GAC>TAT ne peuvent pas être analysées dans le mode quantification des allèles du logiciel PyroMark Q24.

Annexe B : Vidange du conteneur à déchets et des cuves

<p>AVERTISSEMENT</p> 	<p>Produits chimiques dangereux</p> <p>La solution de dénaturation utilisée avec la station de travail sous vide contient de l'hydroxyde de sodium qui peut irriter les yeux et la peau.</p> <p>Toujours porter des lunettes de sécurité, des gants et une blouse de laboratoire.</p> <p>La personne responsable (p. ex. le chef de laboratoire) doit prendre les précautions nécessaires pour s'assurer que l'espace de travail environnant est sûr et que les opérateurs travaillant sur l'instrument ne sont pas exposés à des niveaux dangereux de substances toxiques (chimiques ou biologiques) comme décrit dans les fiches de données de sécurité (FDS) ou dans les documents de l'OSHA*, de l'ACGIH† ou du COSHH‡.</p> <p>La ventilation pour évacuer les fumées et l'élimination des déchets doivent être conformes à toutes les réglementations et lois de sécurité sanitaire nationales, régionales et locales.</p>
---	--

* OSHA : Occupational Safety and Health Administration (Administration de la sécurité et de la santé au travail, États-Unis).

† ACGIH : American Conference of Government Industrial Hygienists (Conférence américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux, États-Unis).

‡ COSHH : Control of Substances Hazardous to Health (contrôle des substances présentant des dangers pour la santé, Royaume-Uni).

S'assurer de respecter les réglementations environnementales nationales, régionales et locales concernant l'élimination des déchets de laboratoire.

Point important avant de commencer

- Ce protocole requiert l'utilisation d'eau ultra-pure (Milli-Q 18,2 MΩ x cm, www.millipore.com, ou équivalent).

Procédure

- B1. Vérifier qu'aucun vide n'est appliqué à l'outil de vide. Vérifier que l'interrupteur à vide est fermé (Off) et que la pompe à vide est éteinte.**
- B2. Jeter toutes les solutions versées dans les cuves.**
- B3. Rincer les cuves avec de l'eau ultra-pure ou les remplacer si nécessaire..**
- B4. Vider le conteneur à déchets.**
le couvercle peut être retiré sans déconnecter le tubage.
- B5. Si la station de travail sous vide doit être nettoyée (par exemple à cause de poussière ou de déversements), suivre les instructions du *Manuel d'utilisation du PyroMark Q24*.**

Pour commander

Produit	Contenu	N° réf.
<i>therascreen</i> GIST RapidScreen Pyro Kit (24)	Pour 24 réactions sur les systèmes PyroMark Q24 : amorces Séq, amorces de PCR, ADN témoin non méthylé, Master Mix PCR PyroMark, CoralLoad concentré, tampon de liaison PyroMark, tampon d'hybridation PyroMark, solution de dénaturation PyroMark, tampon de lavage PyroMark, mélange d'enzyme, mélange de substrat, dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP et H ₂ O	971510
PyroMark Q24 MDx	Plate-forme de détection fondée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001513
PyroMark Q24	Plate-forme de détection fondée sur la séquence pour le pyroséquençage de 24 échantillons en parallèle	9001514
PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation	Station de travail sous vide (220 V) pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001517* 9001515†
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Station de travail sous vide pour la préparation de 24 échantillons en parallèle, du produit PCR à la matrice simple brin	9001518
PyroMark Q24 MDx Software	Logiciel d'application	9019063
PyroMark Q24 Software	Logiciel d'analyse	9019062

* Royaume-Uni uniquement.

† Reste du monde.

Produit	Contenu	N° réf.
Accessoires		
PyroMark Q24 Plate (100)	Plaque de réaction de séquençage à 24 puits	979301
PyroMark Q24 Cartridge (3)	Cartouches pour la distribution des nucléotides et des réactifs	979302
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe (100)	Sondes à filtre réutilisables pour les postes de travail sous vide PyroMark Q96 et Q24	979010
PyroMark Control Oligo	Pour la vérification de l'installation du système	979303
PyroMark Q24 Validation Oligo	Pour la confirmation des performances du système	979304
Produits connexes		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp MinElute®, protéinase K, tampons, tubes de prélèvement (2 mL)	56404
EZ1 DNA Tissue Kit (48)	Pour 48 préparations : cartouches de réactifs (tissu), embouts à filtre jetables, portoirs d'embouts jetables, tubes d'échantillon (2 mL), tube d'élution (1,5 mL), tampon G2, protéinase K	953034
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Pour 50 préparations : Colonnes QIAamp Mini Spin, tampons, réactifs, tubes, VacConnectors	61104

Pour obtenir des informations actualisées et les clauses de responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels des kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles à l'adresse www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des Services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Marques déposées : QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel®, BioRobot®, CoralLoad®, EZ1®, HotStarTaq®, MinElute®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (QIAGEN Group) ; Analyse-it® (Analyse-it Software, Ltd.) ; Applied Biosystems® (Life Technologies Corporation) ; FrameStar® (4titude Ltd.) ; Milli-Q® (Millipore Corporation) ; Sepharose® (GE Healthcare) ; Variomag® (Thermo Fisher Scientific or its subsidiaries) ; Windows® (Microsoft Corporation).

Accord de licence limitée pour le kit *therascreen* GIST RapidScreen Pyro

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour des utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit 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 kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les 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 kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.

HB-1547-002 © 2013-2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

