

Fevereiro 2017

Guia de instalação rápida do EGFR Pyro[®] Plug-in

Para instalação e utilização com instrumentos
PyroMark[®] Q24 e o software PyroMark Q24,
versão 2.0

Sobre o EGFR Pyro Plug-in

A embalagem do EGFR Pyro Plug-in contém o seguinte:

- *Guia de instalação rápida do EGFR Pyro Plug-in*
- Dois ficheiros de instalação
- Relatório de referência para verificação da funcionalidade do EGFR Pyro Plug-in

Nota: O EGFR Pyro Plug-in destina-se a ser utilizado apenas em conjunto com os kits EGFR Pyro dedicados e indicados para as aplicações descritas nos respetivos manuais do kit EGFR Pyro.

Instalação do EGFR Pyro Plug-in

Importante: O EGFR Pyro Plug-in deve ser instalado em **instrumentos PyroMark Q24 com o software PyroMark Q24, versão 2.0.**

1. Feche o software PyroMark Q24 2.0 caso esteja aberto.
2. Abra o ficheiro de instalação *.zip e extraia os ficheiros.
3. Clique duas vezes no ficheiro setup.exe.
4. Siga as instruções nas caixas de diálogo apresentadas.
5. Inicie o software PyroMark Q24, versão 2.0. O EGFR Pyro Plug-in é agora apresentado em "AQ Add On Reports/EGFR" (Adição de AQ em relatórios/EGFR) no menu "Reports" (Relatórios) no modo AQ.
6. Verifique a funcionalidade do Plug-in (consulte "Verificação da funcionalidade do EGFR Pyro Plug-in" abaixo).

Verificação da funcionalidade do EGFR Pyro Plug-in

Importante: A verificação deve ser realizada sempre que um novo software é instalado ou atualizado no computador.

As etapas seguintes descrevem como verificar se o software está a funcionar corretamente e não foi afetado por quaisquer alterações ao computador.

1. Abra o ficheiro de execução de "EGFR Example" (EGFR de exemplo) em "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/EGFR" (Atalhos/Ficheiros de exemplo/Execuções PyroMark/EGFR) no browser de atalhos.
2. Realize uma análise de "EGFR Exon 19 Deletions" (Deleções do exão 19 de EGFR) para todos os poços, conforme descrito em "Análise de uma execução PyroMark Q24" abaixo.
3. Compare os resultados com o relatório de referência. Se os resultados forem idênticos, está confirmado que o EGFR Pyro Plug-in funciona corretamente.

Análise de uma execução PyroMark Q24

As etapas seguintes descrevem a análise de mutação de uma execução de EGFR concluída utilizando o EGFR Plug-in Report.

1. Conecte o dispositivo de armazenamento de dados USB, o qual contém o ficheiro da execução processada, na porta USB do computador.
2. Utilizando o Windows® Explorer, copie o ficheiro de execução do dispositivo de armazenamento de dados USB para a localização pretendida no computador.
3. Abra o ficheiro de execução no modo AQ do software PyroMark Q24, selecionando "Open" (Abrir) no menu "File" (Ficheiro) ou fazendo duplo clique no ficheiro (🖱️) no browser de atalhos.

4. Selecione "AQ Add On Reports/EGFR" e "Exon 18 Codon 719" (Exão 18 Codão 719), "Exon 20 Codon 768" (Exão 20 Codão 768), "Exon 20 Codon 790" (Exão 20 Codão 790), "Exon 21 Codons 858 to 861" (Exão 21 Codões 858 a 861) ou "Exon 19 Deletions" (Deleções do Exão 19) a partir de "Reports" no menu (Figura 1).

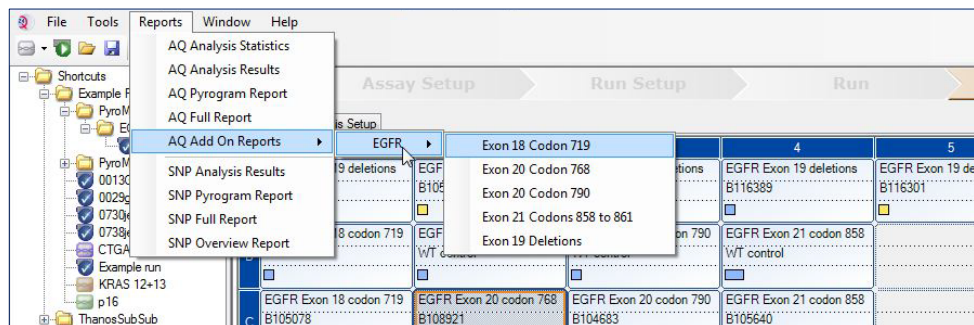


Figura 1. Análise de mutação de uma execução de EGFR concluída utilizando o EGFR Pyro Plug-in.

5. Os poços serão analisados automaticamente em relação a todos os tipos de mutações para as quais o LOD foi atribuído na Tabela 1. Os resultados serão apresentados numa tabela de perspectiva geral (consulte o exemplo na Figura 2 abaixo), seguidos dos resultados detalhados que incluem Pyrograms® e a qualidade de análise.

Tabela 1. LOB e LOD determinados para mutações específicas com o EGFR Pyro Plug-in

Mutação	Substituição de aminoácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V70)
Deleções do exão 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATC	E746_A750>IP	0,8	1,6	13550
2235_2252>AAT	E746_T751>I	1,1	2,8	13551
2235del15	E746_A750del	0,9	1,8	6223
2236del15	E746_A750del	0,2	1,2	6225
2237_2252>T	E746_T751>V	0,8	2,4	12386
2237_2255>T	E746_S752>V	0,6	1,6	12384

Mutação	Substituição de aminoácido	LOB (unidades de %)	LOD (unidades de %)	ID COSMIC* (V70)
2237del15	E746_T751>A	0,9	1,9	12678
2237del18	E746_S752>A	0,5	1,7	12367
2238_2248>GC	L747_A750>P	0,8	2,5	12422
2238_2252>GCA	L747_T751>Q	0,2	0,6	12419
2238del18	E746_S752>D	0,3	1,1	6220
2239_2248>C	L747_A750>P	1,8	2,4	12382
2239_2251>C	L747_T751>P	0,6	1,7	12383
2239_2258>CA	L747_P753>Q	1,3	3,9	12387
2239del18	L747_S752del	0,6	1,5	6255
2239del9	L747_E749del	2,0	3,7	6218
2240del12	L747_T751>S	0,4	1,5	6210
2240del15	L747_T751del	0,9	1,9	12369
2240del18	L747_P753>S	0,9	1,9	12370
Exão 18 Codão 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Exão 20 Codão 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Exão 20 Codão 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Exão 21 Codão 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [†]	6224
Exão 21 Codão 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

* Do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Catálogo de Mutações Somáticas no Cancro), disponível online no Instituto Sanger, em www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.

[†] Nível mais baixo de mutação numa amostra que resulta numa frequência medida \geq LOD.

Summary

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	B104683	Mutation	34.0	2236del15	E746_A750del	
A2	B105072	Wildtype				
A3	B116390	Mutation	26.6	2240del18	L747_P753>S	
A4	B116389	Wildtype				
A5	B116301	Potential low level mutation	3.2	2233del15	K745_E749del	⚠
A6	B116392	Mutation	15.4	2235del15	E746_A750del	
A7	WT control	Wildtype				
A8	NTC	Failed Analysis				⚠

⚠ See detailed results for further explanation.

NOTE: For further information about data evaluation please refer to the handbook.

Figura 2. Exemplo de resumo de resultados de uma análise utilizando o EGFR Pyro Plug-in.

Interpretação de resultados e detecção de mutações de baixo nível

Recomenda-se vivamente a inclusão de uma amostra de tipo selvagem em todas as execuções, para efeitos de comparação e como controlo dos níveis de fundo.

Importante: Uma avaliação de qualidade "Check" (Verificada) ou "Failed" (Falhada) pode ser causada por um padrão inesperado de picos. Isto pode indicar uma mutação inesperada que não é analisada pelo Plug-in Report. Estas amostras devem ser analisadas manualmente com o software PyroMark Q24 e tendo em conta mutações inesperadas. Consulte o manual do kit EGFR Pyro para obter mais detalhes.

Importante: O Pyrogram deve ser sempre comparado com o histograma, o qual é apresentado nos resultados detalhados do Plug-in Report e pode ser apresentado no software PyroMark Q24 clicando com o botão direito na janela do Pyrogram. O Pyrogram deve ser examinado em relação ao aparecimento de picos inesperados. Caso os picos medidos não correspondam às alturas das barras do histograma e não possam ser explicados por mutações raras ou inesperadas, o resultado não serve de base para uma decisão do estado de mutação. Recomenda-se uma nova execução da amostra.

Importante: As amostras com uma indicação de nível de mutação potencialmente baixo (frequência no intervalo de LOD a LOD + unidades de 3%) deverão ser novamente executadas em duplicado, juntamente com uma amostra com ADN de controlo não metilado. Será emitido um aviso neste caso.

Para informações atualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consultar o respetivo manual do kit QIAGEN® ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos aos Serviços Técnicos ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (Grupo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106189 02/2017 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados. PROM-8091-003

Encomendas www.qiagen.com/contact | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com