

Febbraio 2017

Plug-in EGFR Pyro[®]

Guida rapida

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

Informazioni sul plug-in EGFR Pyro

Il pacchetto del plug-in EGFR Pyro include:

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

Nota: Il plug-in EGFR Pyro è destinato esclusivamente all'utilizzo in combinazione con i kit EGFR Pyro dedicati adatti per applicazioni descritte nei rispettivi manuali dei kit EGFR Pyro.

Installazione del plug-in EGFR Pyro

Importante: Il plug-in EGFR Pyro deve essere installato su strumenti **PyroMark Q24 con software PyroMark Q24 versione 2.0.**

1. Se è aperto, chiudere il software PyroMark Q24 2.0.
2. Aprire il file di installazione *.zip ed estrarre i file.
3. Fare doppio clic sul file setup.exe.
4. Seguire le istruzioni delle finestre di dialogo.
5. Avviare il software PyroMark Q24 2.0. Nel menu "Reports" (Report) della modalità AQ, sotto "AQ Add On Reports/EGFR" (Report aggiuntivi AQ/EGFR), compaiono i report del plug-in EGFR Pyro.
6. Verificare la funzionalità del plug-in (vedere "Verifica della funzionalità del plug-in EGFR Pyro" nel seguito).

Verifica della funzionalità del plug-in EGFR Pyro

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

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

1. Aprire la seduta "EGFR Example" (Esempio EGFR) accessibile nel browser dei collegamenti sotto "Shortcuts/Example Files/PyroMark Runs/EGFR" (Collegamenti/File di esempio/sedute PyroMark/EGFR).
2. Eseguire un'analisi "EGFR Exon 19 Deletions" (Delezioni dell'esone 19 del gene EGFR) per tutti i pozzetti come descritto in "Analisi di una seduta PyroMark Q24" nel seguito.
3. Confrontare i risultati con il report di riferimento. Se i risultati sono identici, il corretto funzionamento del plug-in EGFR Pyro è confermato.

Analisi di una seduta PyroMark Q24

La seguente procedura descrive l'analisi delle mutazioni di una seduta EGFR conclusa utilizzando il report del plug-in EGFR.

1. Nella porta USB del computer inserire la penna USB contenente il file del processo elaborato.
2. Utilizzando Windows® Explorer, spostare il file della seduta dalla penna USB alla posizione desiderata sul computer.
3. Aprire il file della seduta nella modalità AQ del software PyroMark Q24, selezionando "Open" (Apri) nel menu "File" oppure facendo doppio clic sul file (📁) nel browser dei collegamenti.

4. Nel menu "Reports" selezionare "AQ Add On Reports/EGFR" e quindi "Exon 18 Codon 719", "Exon 20 Codon 768" (esone 20 codone 768), "Exon 20 Codon 790" (Esone 20 codone 790), "Exon 21 Codons 858 to 861" (esone 21 codoni da 858 a 861) oppure "Exon 19 Deletions" (delezioni dell'esone 19) (Figura 1).

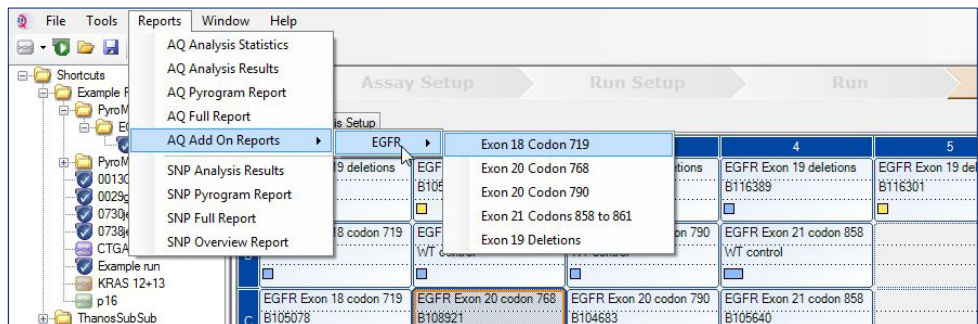


Figura 1. Analisi delle mutazioni di una seduta EGFR conclusa utilizzando il plug-in EGFR Pyro.

5. I pozzetti verranno analizzati automaticamente per rilevare tutte le mutazioni per le quali vengono forniti i valori LOD nella Tabella 1. I risultati vengono presentati in una tabella riassuntiva (vedere l'esempio nella Figura 2 nel seguito), seguita dai risultati dettagliati che includono i tracciati Pyrogram® e la qualità dell'analisi.

Tabella 1. Valori di LOB e LOD determinati per mutazioni specifiche con il Plug-in EGFR

Mutazione	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
Delezioni dell'esone 19				
2233del15	K745_E749del	0,6	1,6	26038
2235_2248>AATTC	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
2237del15	E746_T751>A	0,9	1,9	12678

Mutazione	Sostituzione aminoacido	LOB (unità %)	LOD (unità %)	ID COSMIC* (V70)
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
Esone 18 codone 719 (GGC)				
AGC	G719S	0,9	1,5	6252
TGC	G719C	1,0	1,6	6253
GCC	G719A	4,7	9,1	6239
Esone 20 codone 768 (AGC)				
ATC	S768I	2,6	5,0	6241
Esone 20 codone 790 (ACG)				
ATG	T790M	7,0	10,7	6240
Esone 21 codone 858 (CTG)				
CGG	L858R	0,6	2,6 (5,5) [†]	6224
Esone 21 codone 861 (CTG)				
CAG	L861Q	3,2	4,3	6213
CGG	L861R	1,9	4,2	12374

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

[†] Livello di mutazione più basso che, in un campione, genera una frequenza misurata \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. Esempio di tabella riassuntiva dei risultati di un'analisi mediante plug-in EGFR Pyro.

Interpretazione dei risultati e rilevazione delle mutazioni di basso livello

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

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

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

Importante: I campioni per i quali è riportata la possibile presenza di una mutazione di basso livello (frequenza compresa tra LOD e LOD + 3 unità percentuali) devono essere nuovamente processati in duplicato con un campione di DNA di controllo non metilato. In tal caso viene generata un'avvertenza.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici del prodotto, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN (QIAGEN Technical Services) o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, Pyro®, Pyrogram®, PyroMark® (gruppo QIAGEN); Windows® (Microsoft Corporation).
1106189 02/2017 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati. PROM-8091-003

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