

MANUALE TECNICO

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Istruzioni per l'uso del prodotto
MD3140



ISTRUZIONI PER L'USO
DEL PRODOTTO
MD3140



Rev 0
TM595



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1.	Introduzione.....	3
1.1	Panoramica di OncoMate™ MSI Dx Analysis System	3
1.2	Nome prodotto.....	4
1.3	Abbreviazioni e definizioni	5
1.4	Legenda dei simboli utilizzati	6
1.5	Uso previsto.....	7
1.6	Informazioni di carattere generale	7
1.7	Principio del test	9
2.	Componenti del prodotto e condizioni di conservazione	12
2.1	Materiali forniti con OncoMate™ MSI Dx Analysis System (N. cat. MD3140).....	12
2.2	Conservazione e manipolazione di OncoMate™ MSI Dx Analysis System.....	13
2.3	Materiali non forniti	13
3.	Prima di iniziare	14
3.1	Avvertenze e precauzioni	14
3.2	Requisiti relativi ai campioni	15
3.3	Metodi di estrazione del DNA e requisiti di qualità del DNA.....	15
3.4	Requisiti in termini di quantità di DNA	16
3.5	Requisiti relativi al termociclatore	16
3.6	Requisiti relativi allo strumento per l'elettroforesi capillare.....	16
3.7	Requisiti di calibrazione spettrale per lo strumento per elettroforesi capillare.....	17
3.8	Requisiti relativi al software di analisi dei dati	17
3.9	Requisiti relativi alla soglia analitica	18
4.	Protocollo di test.....	18
4.1	Diluizione degli estratti di DNA del tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina.....	18
4.2	Diluizione del 2800M Control DNA.....	19
4.3	Preparazione delle reazioni di amplificazione OncoMate™ MSI Dx Analysis System.....	20
4.4	Termociclazione	22
4.5	Preparazione dello strumento per l'elettroforesi capillare	23
4.6	Preparazione dei frammenti amplificati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System per l'elettroforesi capillare.....	23
4.7	Rilevamento dei frammenti amplificati mediante elettroforesi capillare con rilevamento della fluorescenza	24
5.	Analisi dei dati.....	24
5.1	Introduzione	24
5.2	Analisi dei dati	26

6.	Esame e interpretazione dei risultati.....	28
6.1	Comprendere i dati di OncoMate™ MSI Dx Analysis System	28
6.2	Riepiloghi degli artefatti di amplificazione noti e delle anomalie nell'elettroforesi capillare	31
6.3	Requisiti di controllo qualità per l'interpretazione dei dati.....	32
6.4	Determinazione della stabilità del marker di ripetizione del mononucleotide	43
6.5	Interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti del tumore	45
7.	Controllo della qualità del test.....	50
7.1	Calibrazione spettrale	50
7.2	Campione di tessuto normale accoppiato	50
7.3	Controlli positivi e negativi.....	50
7.4	Standard dell'elettroforesi capillare	51
7.5	Soglia analitica	51
8.	Limitazioni specifiche.....	52
9.	Risoluzione dei problemi	53
10.	Bibliografia.....	60
11.	Informazioni aggiuntive.....	62
11.1	Appendice A.....	62
11.2	Appendice B.....	63
11.3	Appendice C.....	67

1. Introduzione

1.1 Panoramica di OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Questa guida descrive OncoMate™ MSI Dx Analysis System ed è la principale fonte di informazioni riguardo all'uso previsto, ai componenti, ai limiti, al protocollo, alla risoluzione dei problemi e altro relativi a questo strumento.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System è un dispositivo IVD a marchio CE che utilizza il test basato sulla PCR come parte di un flusso di lavoro di laboratorio più ampio (Figura 1) per analizzare campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) per l'instabilità dei microsatelliti (MSI). OncoMate™ 5C Matrix Standard (N. cat. MD3850)

è necessario per l'analisi dei prodotti amplificati OncoMate™ MSI Dx Analysis System mediante elettroforesi capillare.

Le istruzioni per l'uso di OncoMate™ 5C Matrix Standard sono fornite nel *OncoMate™ 5C Matrix Standard Technical Manual* #TM597.

Il flusso di lavoro completo relativo all'utilizzo di OncoMate™ MSI Dx Analysis System implica l'estrazione del DNA dal campione di tessuto FFPE, la quantificazione del DNA, l'amplificazione dei marker specifici dei microsatelliti tramite PCR multiplex, l'analisi dei frammenti di DNA amplificati mediante elettroforesi capillare e l'analisi dei dati dei frammenti di elettroforesi capillare tramite un software di analisi dei frammenti. Gli utenti di OncoMate™ MSI Dx Analysis System devono selezionare i componenti del flusso di lavoro indicati in base ai requisiti forniti nella Sezione 3. Per ulteriori informazioni, consultare la documentazione tecnica per il metodo di estrazione del DNA, il metodo di quantificazione del DNA, il termociclatore, lo strumento per l'elettroforesi capillare e il software di analisi dei frammenti selezionati.





Isolamento del DNA.



Quantificazione del DNA.

Strumenti, reagenti per la quantificazione del DNA fluorescente o entrambi (vedere la Sezione 1.7).

Amplificazione del DNA.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System (N. cat. MD3140, TM595)

Termociclatore in grado di passare da 3,9 a 5°C/secondo

Calibrazione dello spettro del colorante.

OncoMate™ 5C Matrix Standards (N. cat. MD3850, TM597)

Separazione e rilevamento.

Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer o
strumento per elettroforesi capillare equivalente

Analisi e interpretazione dei dati.

Software di analisi dei frammenti

15207TB

Figura 1. Flusso di lavoro del laboratorio associato a OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

1.2 Nome prodotto

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

N. cat. MD3140, 100 reazioni



1.3 Abbreviazioni e definizioni

bp, coppia di basi

CRC, carcinoma del colon retto

DCS, software di raccolta dati

dMMR, deficit della riparazione del mismatch

dsDNA, DNA a doppia catena

ESMO, European Society for Medical Oncology

FFPE, fissato in formalina, incluso in paraffina

HNPCC, carcinoma del colon retto non poliposico

ICI, inibitore del checkpoint immunologico

LOH, perdita di eterozigosi

MMR, riparazione del mismatch

MSI, instabilità dei microsatelliti

MSI-H, instabilità elevata dei microsatelliti: risultato dell'interpretazione del campione quando due o più marker sono instabili

MSS, microsatelliti stabili: risultato dell'interpretazione del campione quando il numero di marker instabili è inferiore a due

PCR, reazione a catena della polimerasi

RFU, unità relative di fluorescenza

QC, controllo della qualità

NA, non applicabile

Allele: una di due o più forme (ad esempio la lunghezza) di un marker del DNA

Bleedthrough: artefatti dell'elettroforesi capillare dove i picchi di un canale di colorante vengono rilevati in un secondo canale di colorante all'incirca alla stessa dimensione (bp), noto anche come "pull-up spettrale"

Marker DNA: sequenza di interesse all'interno del genoma

Eterozigote: gli alleli per un marker DNA hanno forme diverse

Omozigote: gli alleli per un marker DNA hanno la stessa forma

Ripetizione del mononucleotide: struttura del DNA dove viene ripetuta la stessa base del nucleotide



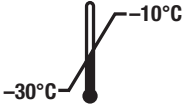










Quasimonomorfo: marker DNA per il quale la maggior parte degli individui sono omozigoti per lo stesso allele comune

Stabile: la modifica della dimensione dell'allele, indicativa del deficit della riparazione del mismatch è assente

Picco stutter: artefatto PCR causato dallo slittamento della polimerasi durante la replicazione in vitro del DNA. I picchi stutter sono una o più unità ripetute più corte o più lunghe del picco di alleli reale

Instabile: la modifica della dimensione dell'allele, indicativa del deficit della riparazione del mismatch è presente

1.4 Legenda dei simboli utilizzati

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Mandatario nella Comunità Europea
	Conservare a temperature comprese fra -30°C e -10°C		Fabbricante
	Conformità alle normative europee		Irritante
	Numero catalogo		Numero lotto
	Non riutilizzare		Contenuto sufficiente per <n> test
	Utilizzare entro		Proteggere dalla luce
	Consultare le istruzioni per l'uso		

1.5 Uso previsto

OncoMate™ MSI Dx Analysis System è un test di dimensionamento dei frammenti basato su PCR utilizzato per determinare lo stato di instabilità dei microsatelliti (MSI) nel DNA purificato di campioni di tessuto umano fissato in formalina e incluso in paraffina derivati dai tumori solidi.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System genera profili allelici da campioni di tessuto FFPE di origine tumorale e non dello stesso paziente tramite l'amplificazione mediante PCR dei marker dei microsatelliti di DNA, seguita dalla separazione in base alle dimensioni dei marker amplificati utilizzando l'elettroforesi capillare. Lo stato di instabilità dei microsatelliti viene determinato confrontando i profili allelici. Un'espansione o una riduzione nella lunghezza delle sequenze di DNA ripetitive nel DNA delle cellule tumorali se confrontate con il DNA delle cellule normali dello stesso paziente indica l'instabilità dei microsatelliti. Affinché i risultati siano validi, il tessuto normale e il tessuto tumorale dello stesso paziente devono essere testati contemporaneamente e i dati di entrambi i campioni devono essere disponibili per il confronto.

L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System non è destinato alla diagnosi di una specifica patologia. Il sistema è destinato a essere utilizzato con i pazienti ai quali è stato già diagnosticato il cancro che possono usufruire di ulteriori test genetici. I risultati del test ottenuti utilizzando il prodotto devono essere interpretati dai professionisti del settore sanitario insieme ad altri risultati clinici, all'anamnesi familiare e ai dati di laboratorio. Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale.

1.6 Informazioni di carattere generale

I microsatelliti sono sequenze corte e ripetitive di DNA composte da unità ripetute di un numero di nucleotidi compreso tra uno e sei [ad esempio, (A)_n, (CA)_n, (AAAAG)_n]. Le sequenze di microsatelliti sono distribuite in tutto il genoma umano e sono soggette a errori di inserimento e di eliminazione durante la replicazione del DNA. Di norma, gli errori vengono riparati dal sistema di riparazione del mismatch del DNA cellulare. L'instabilità dei microsatelliti viene osservata quando la funzione MMR è deficitaria e gli errori di replicazione del DNA non vengono riparati, causando lunghezze diverse degli alleli dei microsatelliti nei campioni di tessuto in cui la funzione MMR è deficitaria rispetto ai campioni di tessuto normale (Bacher, 2004; Boland, 2010; Ionov, 1993; Umar, 2004; Wang, 2017).

Tra i microsatelliti, le ripetizioni di mononucleotide sono quelle in cui è più probabile che venga riscontrata l'instabilità (Bacher, 2004; Ionov, 1993). L'instabilità dei microsatelliti può derivare da diversi meccanismi sottostanti, inclusa la mutazione somatica e della linea germinale dei geni MMR e le alterazioni delle aree dei promotori dei geni MMR. Negli individui che presentano difetti dell'MMR, l'accumulo delle mutazioni può portare alla disfunzione cellulare e, in ultima istanza, al cancro (Boland, 2010; Le, 2015; Timmermann, 2010).

L'instabilità dei microsatelliti è altamente correlata alla sindrome di Lynch. La sindrome di Lynch è un disturbo autosomico dominante causato dalle mutazioni della linea germinale in uno qualsiasi dei quattro geni MMR maggiori (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) e rappresenta una predisposizione al cancro. L'identificazione di individui affetti dalla sindrome di Lynch consente di individuare in anticipo il cancro e di intervenire a un punto della malattia nel quale è più possibile influire sulla sopravvivenza. A livello del genoma, un errore di un gene MMR genera una perdita di espressione o di funzione della proteina MMR corrispondente. L'instabilità dei microsatelliti deriva dal deficit MMR e pertanto informa, insieme all'anamnesi clinica e familiare, di una suscettibilità genetica sottostante. Le forme di cancro

comune associate alla sindrome di Lynch includono il cancro del colon retto e dell'endometrio; tuttavia, la sindrome di Lynch è stata identificata in quasi tutti i tipi di tumore solido (Cortes-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018). Sono diverse le associazioni di oncologia clinica che promuovono lo screening universale dell'instabilità dei microsatelliti per il cancro del colon retto e dell'endometrio, per identificare i candidati di ulteriori test genetici per la sindrome di Lynch. Tra queste la European Society for Medical Oncology (ESMO; Stjepanovic, 2019), la National Comprehensive Cancer Network (CRC, EC) e l'American Society of Clinical Oncology (Sepulveda, 2017; Stoffel, 2015).

Di recente, l'instabilità dei microsatelliti è stata associata alla risposta delle terapie degli inibitori del checkpoint immunitario (ICI) (Le, 2015; Overman, 2017). Le terapie ICI mirano ai recettori dell'immunosoppressione o ai relativi ligandi e, con il trattamento, le cellule immuni di un individuo sono più efficienti nel combattere il cancro. A causa della funzione MMR difettosa del DNA, i tumori MSI-high (MSI-H) sono ipermutati e producono una maggiore quantità di neoantigeni o neoepitopi, alcuni dei quali sono pensati per essere immunogenici e attivare una risposta immunitaria contro il cancro (Le, 2017). Di conseguenza, spesso i tumori MSI-H sono antigenici e mostrano una maggiore infiltrazione linfocitaria, uno scenario in cui è probabile che il paziente risponda a un ICI. L'identificazione dei pazienti che potrebbero usufruire di questi trattamenti fornisce ulteriori opzioni e informazioni per i professionisti del settore sanitario. L'instabilità dei microsatelliti è stata osservata in molti tipi di tumore (Cortes-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018), e la risposta all'ICI è stata dimostrata tra i tumori MSI-H di più siti di origine (Le, 2015). La European Society for Medical Oncology (ESMO) ha riconosciuto l'importanza di testare l'instabilità dei microsatelliti e il deficit della riparazione del mismatch per supportare l'idoneità del paziente alle terapie ICI e a questo scopo ha riepilogato le raccomandazioni relative al test dell'instabilità dei microsatelliti (Luchini, 2019, Stjepanovic, 2019).

L'ESMO Translational Research and Precision Medicine Working Group raccomanda il test dell'instabilità dei microsatelliti sullo spettro dei tumori della sindrome di Lynch in quanto la potenziale utilità dell'ICI in questi tipi di cancro e l'identificazione della sindrome di Lynch possono costituire un vantaggio per tutti i membri della famiglia. È consigliabile l'utilizzo congiunto dell'instabilità dei microsatelliti tramite PCR e dell'analisi dMMR tramite IHC a causa di report passati di tassi alti di falsi positivi ottenuti con i test sviluppati dai laboratori locali. Infine, il comitato raccomanda pannelli di cinque marker di ripetizione del mononucleotide per l'elevata sensibilità e specificità rispetto ai pannelli che includono marker di ripetizione del dinucleotide (Luchini, 2019).

1.7 Principio del test

L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è un test multiplex PCR basato sulla fluorescenza per individuare le modifiche nella lunghezza delle sequenze del DNA nelle aree dei microsatelliti del DNA delle cellule tumorali rispetto alle stesse aree delle cellule normali del paziente. L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System mira a sette marker dei microsatelliti: cinque marker di ripetizione del mononucleotide (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27) e due marker di ripetizione del pentanucleotide (Penta C e Penta D; Tabella 1, Figura 2). Tali marker di ripetizione del mononucleotide vengono analizzati per determinare lo stato dell'instabilità dei microsatelliti e sono stati selezionati per l'elevata sensibilità e specificità alle alterazioni nelle lunghezze ripetute nei campioni contenenti difetti di riparazione del mismatch. Per ognuno dei cinque marker di ripetizione del mononucleotide, le dimensioni degli alleli (in coppia di basi, bp) nel campione tumorale vengono confrontate con quelle del campione normale per stabilire se è presente un nuovo allele che rappresenta l'instabilità dei microsatelliti (Figura 3). Un marker viene interpretato come instabile quando si rileva un nuovo allele le cui dimensioni differiscono di almeno 2,75 bp (3 basi meno 0,25 bp per la precisione del dimensionamento dell'elettroforesi capillare) rispetto all'allele di riferimento nel campione normale. Un campione tumorale è considerato MSI-H quando due o più marker sono interpretati come instabili. Un campione tumorale è considerato MSS quando meno di due marker sono interpretati come instabili (Hampel, 2008; Boland, 1998). Mentre questi marker sono quasimonomorfici (vale a dire che la maggior parte degli individui è omozigote per gli stessi alleli comuni) e il tessuto normale in genere mostrerà una singola distribuzione di picchi in ciascun marker mononucleotide, tra gli individui è stata osservata l'eterozigotità a bassa frequenza o la variazione nella lunghezza degli alleli nel tessuto normale. A causa della possibilità dell'eterozigotità, i dati delle coppie di campioni normali e di campioni tumorali (carcinoma del colon retto) devono essere interpretati insieme per determinare lo stato dell'instabilità dei microsatelliti. Due marker di ripetizione del pentanucleotide vengono analizzati come conferma di identità tra i campioni di DNA normali e tumorali e sono stati selezionati per l'elevato livello di polimorfismo e il ridotto grado di instabilità dei microsatelliti (Bacher, 2004). Quando tutti gli alleli rilevati nel campione normale sono presenti anche nel campione tumorale, l'identità del campione è supportata.

Tabella 1. Intervalli di dimensioni amplificate e canali di rilevamento previsti per i marker inclusi in OncoMate™ MSI Dx Analysis System Amplification Kit. Gli intervalli corrispondono alle dimensioni previste per i dati generati utilizzando il POP-7® Polymer e una matrice capillare di 50 cm.

Marker mononucleotide	Struttura ripetuta	Canale di rilevamento	Intervallo di dimensioni amplificate
BAT-26	A ₍₂₆₎	Blu	83 - 121 bp
NR-21	A ₍₂₁₎	Verde	83 - 108 bp
BAT-25	A ₍₂₅₎	Verde	110 - 132 bp
MONO-27	A ₍₂₇₎	Verde	134 - 168 bp
NR-24	A ₍₂₄₎	Giallo (visualizzato nero)	103 - 138 bp
Marker pentanucleotide	Struttura ripetuta	Canale di rilevamento	Intervallo di dimensioni amplificate
Penta D	AAAGA ₍₂₋₁₇₎	Blu	123 - 253bp
Penta C	AAAAC ₍₄₋₁₇₎	Giallo (visualizzato nero)	140 - 228bp

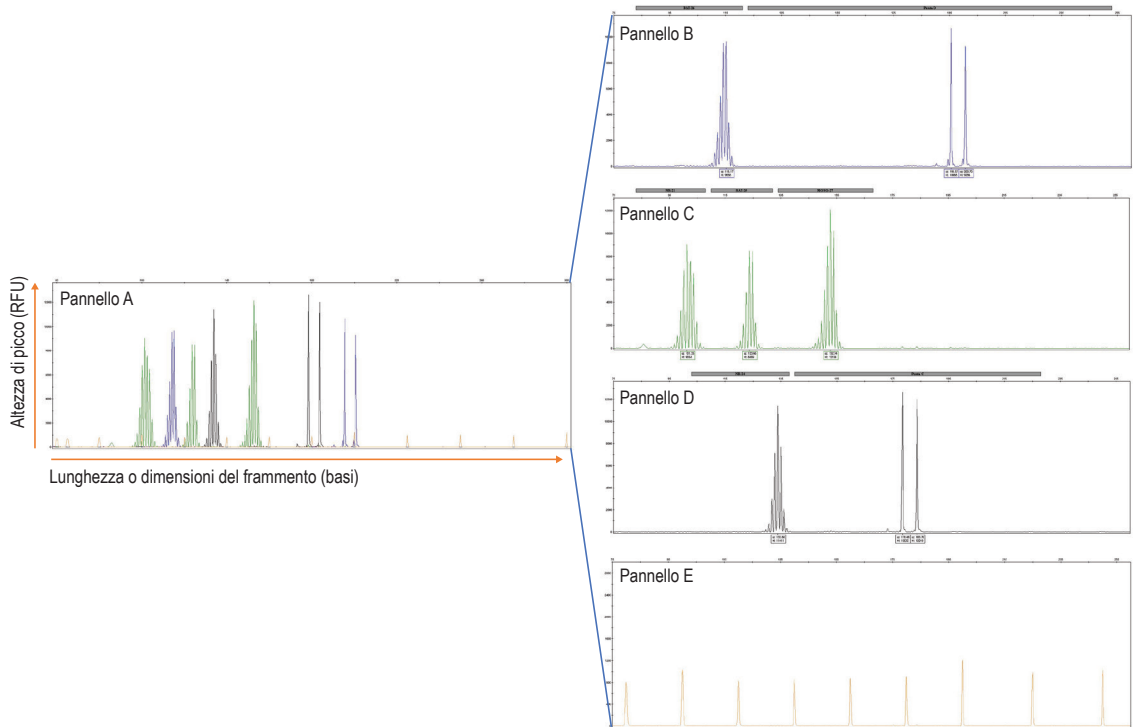
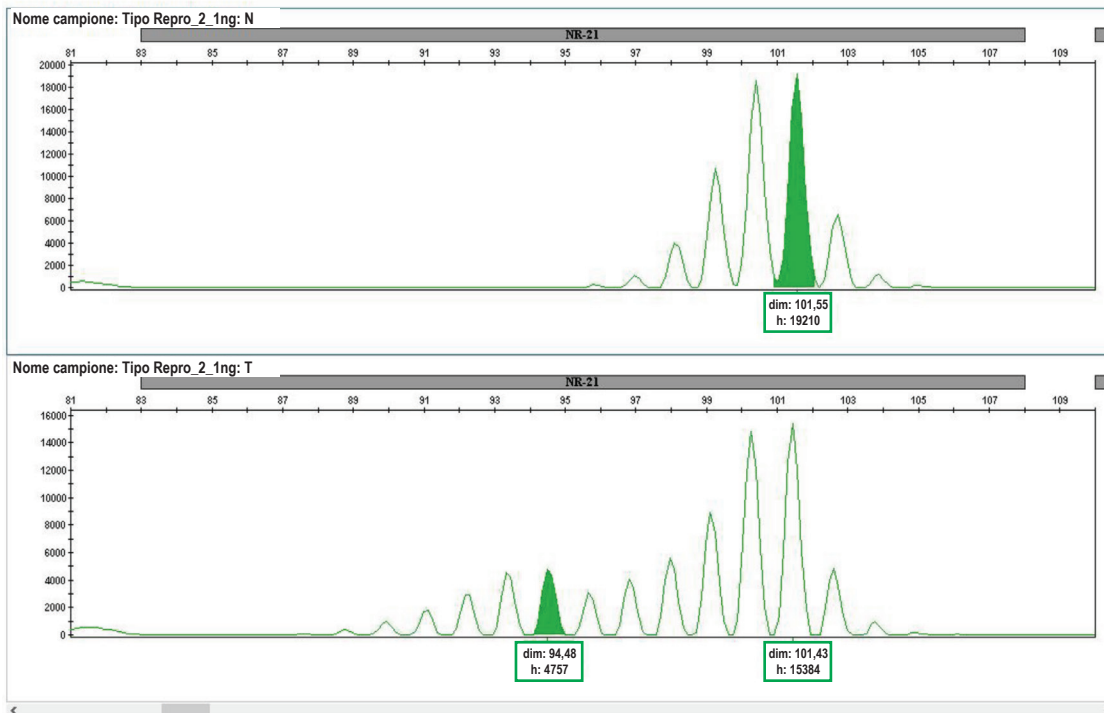


Figura 2. Esempio di dati di OncoMate™ MSI Dx Analysis System. È stato amplificato un singolo modello di DNA genomico (1 ng) utilizzando OncoMate™ MSI Dx Analysis System, e i prodotti PCR sono stati analizzati con Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con il POP-7® Polymer e la matrice capillare di 50 cm. **Riquadro A.** Elettroferogramma che mostra il rilevamento simultaneo di tutti i frammenti di DNA etichettati in modo fluorescente. **Riquadri B–E.** Dati dei microsatelliti visualizzati per canale di rilevamento, in modo da semplificare l'interpretazione. Il Riquadro E illustra picchi di frammenti Size Standard 500.




16114TA

Figura 3. Valutazione della stabilità dei marker mononucleotide. Nell'esempio precedente, sono evidenziati gli alleli dei microsatelliti di interesse. Per un marker mononucleotide, se la differenza di dimensioni tra il nuovo allele nel campione tumorale e l'allele di riferimento nel campione normale è di almeno 2,75 bp, il marker viene interpretato come instabile. In questo esempio, l'allele di riferimento nel campione normale (elettroferogramma in alto) è 101,55 bp, mentre il nuovo allele nel campione tumorale (elettroferogramma in basso) è 94,48 bp. La differenza di dimensioni tra questi due alleli è di 7,07 bp; si tratta di una differenza $\geq 2,75$ bp, pertanto il marker NR-21 viene interpretato come instabile.

Utilizzando la PCR multiplex con i primer con etichetta con colorante fluorescente, tutte e sette le aree dei microsatelliti vengono amplificate all'interno della stessa reazione per generare prodotti della PCR con etichetta con colorante. I prodotti della PCR e uno standard di dimensioni con etichetta fluorescente, Size Standard 500, vengono quindi aggiunti alla formamide e denaturati a caldo. Il DNA a filamento singolo che ne risulta viene iniettato in modo elettrocinetico in uno strumento per l'elettroforesi capillare, nel quale i frammenti di DNA vengono separati in base alle dimensioni e rilevati tramite l'etichetta fluorescente incorporata. L'analisi dello standard delle dimensioni insieme ai frammenti del DNA dei microsatelliti consente un dimensionamento preciso e il confronto diretto delle dimensioni tra i campioni. Dopo l'elettroforesi capillare, i file (.fsa) dei dati dei frammenti di DNA che ne risultano e che sono generati dallo strumento possono essere analizzati utilizzando un software per l'analisi dei frammenti al fine di determinare la dimensione dei frammenti e identificare gli alleli.

2. Componenti del prodotto e condizioni di conservazione


2.1 Materiali forniti con OncoMate™ MSI Dx Analysis System (N. cat. MD3140)

 Il prodotto contiene reagenti sufficienti a eseguire 100 reazioni (50 coppie di reazioni).

Sono inclusi i seguenti materiali.

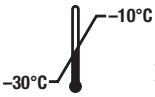
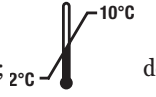
COMPONENTE	DIMENSIONI	N. PARTE
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	200µl	MD705A

Include: primer con etichetta fluoroforo e primer senza etichetta per BAT-26, Penta D, NR-21, BAT-25, MONO-27, NR-24 e Penta C in una soluzione tamponata.

 **Condizioni di conservazione:** area di preamplificazione;  prima dell'uso;  dopo il primo utilizzo. Proteggere dalla luce.

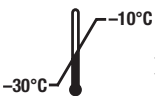
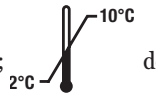
COMPONENTE	DIMENSIONI	N. PARTE
OncoMate™ MSI 5X Master Mix	200µl	MD280A

Include: GoTaq® MDx Hot Start DNA Polymerase, dNTP, cloruro e sali di magnesio in una soluzione tamponata con stabilizzatori.


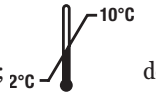
Condizioni di conservazione: area di preamplificazione;  prima dell'uso;  dopo il primo utilizzo.

COMPONENTE	DIMENSIONI	N. PARTE
2800M Control DNA, 10ng/µl	25µl	MD810A

Include: standard DNA genomico maschile derivato dalla linea di cellule.

Condizioni di conservazione: area di preamplificazione;  prima dell'uso;  dopo il primo utilizzo.

COMPONENTE	DIMENSIONI	N. PARTE
Water, Amplification Grade	1,25ml	MD193A

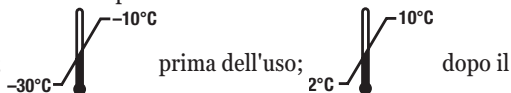
Condizioni di conservazione: area di preamplificazione;  prima dell'uso;  dopo il primo utilizzo.

COMPONENTE	DIMENSIONI	N. PARTE
Size Standard 500	100µl	MD500A

Include: frammenti di DNA con etichetta fluoroforo in una soluzione tamponata.



Condizioni di conservazione: area di post-amplificazione; primo utilizzo. Proteggere dalla luce.



2.2 Conservazione e manipolazione di OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Al momento della ricezione, conservare tutti i componenti a una temperatura compresa tra -30°C e -10°C in un freezer no frost. Prima del primo utilizzo, conservare 2800M Control DNA a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C per almeno 8 ore. Dopo il primo utilizzo, conservare OncoMate™ MSI Dx Analysis System a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C per almeno 3 mesi. OncoMate™ MSI 5X Primer Mix e Size Standard 500 sono sensibili alla luce e devono essere conservati al buio. Non ricongelare. Conservare i reagenti di preamplificazione e post-amplificazione in ambienti separati e utilizzare pipette, rack di provette ecc. dedicate. I componenti conservati in condizioni diverse da quelle indicate sulle etichette potrebbero non funzionare correttamente e compromettere i risultati.



2.3 Materiali non forniti

Reagenti di laboratorio

- Sistema di estrazione del DNA (vedere le Sezioni 3.3 e 3.4)
- OncoMate™ 5C Matrix Standard (N. cat. Promega MD3850)
- Hi-Di™ Formamide (ad es., N. cat. Applied Biosystems 4404307)
- Reagenti di quantificazione dsDNA basati su colorante fluorescente (vedere la Sezione 3.4)
- Acqua priva di nucleasi (N. cat. Promega MC1191)

Nota: è fondamentale utilizzare Hi-Di™ Formamide di qualità elevata. Congelare Hi-Di™ Formamide in aliquote a una temperatura compresa tra -30°C e -10°C . Più cicli di congelamento-scongelamento o la conservazione a lungo termine a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C possono causare il degrado della formamide. La formamide di scarsa qualità può contenere ioni che competono con il DNA durante l'iniezione, causando altezze di picco ridotte e ridotta sensibilità.

Forniture di laboratorio

Nota: la seguente attrezzatura di laboratorio è necessaria in due aree distinte del laboratorio, una per le procedure di preamplificazione e una per le procedure di post-amplificazione.

- Serie di pipette di precisione in grado di erogare da $1\ \mu\text{l}$ a $1.000\ \mu\text{l}$
- Punte per pipette resistenti all'aerosol (da $10\ \mu\text{l}$ a $1.000\ \mu\text{l}$)
- Provette per microcentrifuga da $1,5\ \text{ml}$
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (N. cat. Thermo Fisher Scientific 4306737)
- MicroAmp® 8-Cap Strip, trasparenti (N. cat. Thermo Fisher Scientific N8010535) (solo preamplificazione)

- Microcentrifuga personale (minicentrifuga)
- Centrifuga compatibile con piastre a 96 pozzetti (ad esempio minicentrifuga con piastre)
- Rack per provette per microcentrifuga
- Agitatore
- Freezer no frost a temperature comprese tra -30°C e -10°C
- Frigorifero a temperature comprese fra 2°C e 10°C
- Ghiaccio tritato (solo post-amplificazione)
- Attrezzatura per l'estrazione del DNA (ad esempio, blocchi di riscaldamento, centrifughe), basata solo su alcuni metodi (solo preamplificazione)

Strumenti e accessori

- Strumento di estrazione del DNA, in caso di metodo automatizzato
- Strumento di quantificazione del DNA e forniture associate
- Strumento per l'elettroforesi capillare e forniture associate
- Termociclatore compatibile con le piastre a 96 pozzetti

Software

- Software di analisi dei frammenti (vale a dire, software in grado di analizzare i file .fsa dello strumento di elettroforesi capillare)

3. Prima di iniziare

3.1 Avvertenze e precauzioni



Avvertenza per la sicurezza chimica: alcuni reagenti utilizzati con l'analisi dei frammenti sono potenzialmente pericolosi. Gestire e smaltire i materiali pericolosi in base alle linee guida definite dalla propria struttura.

La formammide è una sostanza irritante e teratogena. Evitare l'inalazione e il contatto con la cute. Leggere l'etichetta di avvertenza e applicare le precauzioni appropriate nel maneggiare questa sostanza. Indossare sempre guanti e occhiali di sicurezza quando si lavora con la formammide. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza per la formammide fornite dal produttore.

Dichiarazione relativa alle schede di sicurezza: informazioni importanti relativi alla manipolazione, al trasporto e allo smaltimento di questo prodotto sicuri di questo prodotto sono contenute nella scheda di sicurezza. Le schede di sicurezza per tutti i reagenti forniti nei kit sono disponibili online al seguente indirizzo:

www.promega.com/resources/msds/ o inviando una richiesta all'assistenza tecnica Promega al seguente indirizzo e-mail: **genetic@promega.com**

Precauzioni per la biosicurezza: OncoMate™ MSI Dx Analysis System è destinato all'uso con i tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina. Per la manipolazione e lo smaltimento di questi tessuti, seguire le linee guida definite dalla propria struttura.

Precauzioni PCR: la qualità del DNA purificato, i piccoli cambiamenti nei tamponi, la forza ionica, le concentrazioni di primer, il volume di reazione, la scelta del termociclatore e le condizioni dei cicli termici possono influire sulla riuscita della PCR. Pertanto OncoMate™ MSI Dx Analysis System deve rispettare rigorosamente le procedure consigliate per l'amplificazione e il rilevamento della fluorescenza descritte nel presente manuale.

Riduzione al minimo della contaminazione: l'analisi dei microsatelliti basata sulla PCR è soggetta alla contaminazione da parte di piccolissime quantità di DNA umano. È necessario prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione crociata nella preparazione del DNA del modello, nella manipolazione dei componenti del kit, nell'assemblaggio delle reazioni di amplificazione e nell'analisi dei prodotti dell'amplificazione. Conservare e utilizzare i reagenti e i materiali utilizzati prima dell'amplificazione (OncoMate™ MSI 5X Master Mix, OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, 2800M Control DNA e l'acqua con grado di amplificazione) in un ambiente separato rispetto a quello utilizzato dopo l'amplificazione (Size Standard 500). Preparare le reazioni di amplificazione in un ambiente dedicato alla messa a punto della reazione. Utilizzare attrezzature e forniture dedicate per la messa a punto dell'amplificazione. Includere sempre una reazione di controllo negativa (vale a dire senza modello) per rilevare la contaminazione del reagente e una reazione di controllo positiva per verificare le prestazioni del reagente. Indossare i guanti e utilizzare punte delle pipette resistenti all'aerosol per evitare la contaminazione crociata.

3.2 Requisiti relativi ai campioni

Le sezioni di tessuto idonee all'uso con il test vengono preparate utilizzando formalina neutra tamponata al 10%, seguendo le pratiche di patologia standard e contengono cellule nucleate sufficienti e un contenuto tumorale di $\geq 20\%$ di cellule tumorali, in base all'esame patologico. La valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stata condotta utilizzando il DNA estratto con Maxwell® CSC Instrument e Maxwell® CSC DNA FFPE Kit da campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina di cancro del colon retto.

3.3 Metodi di estrazione del DNA e requisiti di qualità del DNA

Ottenere una quantità sufficiente di DNA di elevata qualità da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina può essere un problema. Il DNA può risultare degradato a causa di fissazione del campione di tessuto prolungata o non idonea prima dell'inclusione in paraffina, ed è possibile che nel processo di estrazione vengano coinvolti gli inibitori dell'amplificazione contenuti nel campione fissato in formalina e incluso in paraffina o relativi al metodo di estrazione. È responsabilità dell'utente verificare la compatibilità del metodo di purificazione del DNA con questo test. I controlli del test PCR possono essere utilizzati per identificare la presenza degli inibitori dell'amplificazione negli estratti di DNA purificati.

Le prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sono state valutate utilizzando il DNA estratto dai campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina mediante Maxwell® CSC DNA FFPE Kit (N. cat. AS1350) in combinazione con Maxwell® CSC Instrument (N. cat. AS6000). È stato dimostrato che la presenza di una quantità di etanolo pari al 5% o fino a 50 μM di guanidina cloridrato nel DNA non interferisce con le prestazioni di OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.4 Requisiti in termini di quantità di DNA

Il kit per l'amplificazione OncoMate™ MSI Dx Analysis System è destinato all'uso con 1 ng di DNA. È necessario quantificare il DNA prima dell'uso. Le misurazioni dell'assorbimento UV non sono affidabili per la quantificazione del dsDNA purificato dai campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Per una stima della concentrazione di DNA, è consigliabile l'uso di coloranti fluorescenti o la PCR quantitativa. Entrambi questi metodi forniscono una quantificazione più affidabile del DNA purificato dai campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, in particolare quando le concentrazioni di DNA sono basse o quando gli eluati di DNA contengono contaminanti comuni (ad esempio, RNA, nucleotidi liberi, solventi, detergenti, proteine o sali).

L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stato valutato con campioni di DNA CRC utilizzando coloranti che si legano al dsDNA in grado di misurare con precisione concentrazioni di dsDNA fino a 0,05 ng/μl. Durante la valutazione delle prestazioni, il DNA è stato quantificato con il QuantiFluor® dsDNA System (N. cat. E2670) destinato all'uso generale in laboratorio.

3.5 Requisiti relativi al termociclatore

Le prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sono state valutate utilizzando i termociclatori Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® e Bio-Rad C1000 Touch™, che condividono le seguenti specifiche minime:

Velocità massima di rampa del blocco: 3,9°C/secondo fino a 5°C/secondo

Precisione di temperatura: ±0,25°C (a ≥90°C)

Uniformità di temperatura: <0,5°C (a ≥90°C)

Coperchio riscaldato in grado di raggiungere una temperatura compresa tra 103°C e 105°C

Le prestazioni di questo test possono essere influenzate negativamente dall'uso di termociclatori con specifiche esterne agli intervalli indicati.

3.6 Requisiti relativi allo strumento per l'elettroforesi capillare

I prodotti di amplificazione OncoMate™ MSI Dx Analysis System vengono separati per lunghezza dei frammenti (dimensioni) mediante l'elettroforesi capillare. Eccetto che per la selezione di un set di coloranti basato sul metodo di calibrazione spettrale AnyDye (Qualsiasi colorante), per l'analisi dei frammenti è stato utilizzato il metodo di calibrazione predefinito Fragment Analysis (Analisi dei frammenti) fornito dal software di raccolta dei dati, e il tempo di iniezione è stato variato per ottenere l'altezza appropriata dei picchi di frammenti. Per 2800M Control DNA, è stata utilizzata come bersaglio un'altezza di picco di circa 8.000 unità relative di fluorescenza (RFU) per i sette marker dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Le prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sono state valutate utilizzando l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer configurato con il POP-7® Polymer e una matrice capillare di 50 cm. Le condizioni di funzionamento utilizzate durante la valutazione delle prestazioni sono elencate nell'Appendice B (Sezione 11.2). Gli strumenti per l'elettroforesi capillare compatibili per l'uso con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System condivideranno le seguenti specifiche:

Numero di coloranti rilevati: ≥ 5

Lunghezza della matrice capillare: lunghezze di matrice indicate per la risoluzione a base singola, inclusa la lunghezza di 50 cm

Matrice di separazione: POP-7[®] o equivalente

Lunghezza di eccitazione (approssimativa): da 480 nm a 520 nm

Ottica di rilevamento: i coloranti Promega richiedono l'acquisizione delle emissioni da 500 nm a 630 nm circa

Intervallo di risoluzione: risoluzione di 1 bp da 60 bp a ≥ 300 bp

Precisione di dimensionamento (ripetibilità, espressa come deviazione standard): $\leq 0,15$ bp in un intervallo compreso tra 60 bp e ≥ 300 bp

È responsabilità dell'utente verificare la compatibilità dello strumento per l'elettroforesi capillare e del metodo di analisi selezionati con i prodotti amplificati OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.7 Requisiti di calibrazione spettrale per lo strumento per elettroforesi capillare

Prima del primo utilizzo, eseguire una calibrazione speciale dello strumento per l'elettroforesi capillare utilizzando l'OncoMate™ 5C Matrix Standard (N. cat. MD3850). La calibrazione spettrale viene effettuata seguendo il *OncoMate™ 5C Matrix Standard Technical Manual* n. TM597 con riferimento alla guida per l'utente per lo strumento per l'elettroforesi capillare. Questa procedura fornisce i dati necessari per consentire allo strumento per l'elettroforesi capillare di risolvere i segnali fluorescenti sovrapposti provenienti da più frammenti di DNA con etichetta colorata dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Le impostazioni di calibrazione utilizzate durante la valutazione delle prestazioni sono elencate nell'Appendice A (Sezione 11.1). Eseguire una nuova calibrazione spettrale rispettando le raccomandazioni del produttore dello strumento per l'elettroforesi capillare. Ad esempio, dopo un intervento di manutenzione importante sul sistema per l'elettroforesi capillare, ad esempio la modifica della fonte di eccitazione (come il laser), la calibrazione o la sostituzione dell'ottica o la modifica del tipo di polimero o di matrice capillare, è necessaria una nuova calibrazione spettrale.

3.8 Requisiti relativi al software di analisi dei dati

Per analizzare i dati dell'elettroforesi capillare dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, è necessario il software di analisi dei frammenti. Il software di analisi dei frammenti idoneo accetterà i file dei dati dei frammenti (.fsc), calcolerà le dimensioni dei frammenti utilizzando il metodo Local Southern (Meridionale locale), attribuirà i frammenti a un marker in base all'intervallo di dimensioni e all'etichetta fluorescente (vale a dire, il colore), organizzerà i dati di una combinazione di frammenti di diverse dimensioni (da ≥ 65 bp a 300 bp) e colori (≥ 5) visualizzandoli sotto forma di tabelle e stamperà ed esporterà i dati analizzati in base alla dimensione calcolata dell'allele e al marker. Il software idoneo inoltre visualizzerà le informazioni relative alla qualità dei dati (ad esempio, i picchi fuori scala) acquisite durante l'elettroforesi capillare e calcolerà i parametri QC di base (ad esempio, l'identificazione di picchi ampi) secondo le impostazioni definite dall'utente.

I dati generati durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sono stati analizzati con GeneMapper[®] Software versione 5.0 e le impostazioni di analisi elencate nell'Appendice C (Sezione 11.3).

3.9 Requisiti relativi alla soglia analitica

L'utente deve determinare la soglia di test (vale a dire, il rilevamento) del dosaggio prima dell'analisi dei dati. La soglia analitica definisce il valore RFU al di sopra del quale è possibile distinguere i segnali del campione dal rumore della strumentazione, consentendo all'utente di analizzare con affidabilità i dati dei frammenti. La definizione di una soglia analitica è fondamentale per garantire la qualità dei dati paziente (vedere la Sezione 7.5). Le procedure idonee per determinare la soglia analitica sono disponibili nella documentazione tecnica (ad esempio, Bregu, 2013). Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System sul Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer, abbiamo utilizzato una soglia analitica di 175RFU tra tutti i canali di colorante, determinata utilizzando l'approccio del limite superiore, basato sulla regressione lineare delle intensità di picco, generate dai campioni contenenti ingressi di DNA differenti (Bregu, 2013).

4. Protocollo di test

Tenere i reagenti di preamplificazione e post-amplificazione in ambienti separati. Preparare le diluizioni del modello di DNA e le reazioni di amplificazione in un ambiente dedicato alla messa a punto della reazione. Utilizzare attrezzature e forniture dedicate per la messa a punto dell'amplificazione. Indossare i guanti e utilizzare punte delle pipette resistenti all'aerosol per evitare la contaminazione crociata del DNA. Quando si aggiunge ciascun campione di DNA, utilizzare una pipetta fresca, il 2800M Control DNA e l'acqua con grado di amplificazione (per i controlli negativi) per le reazioni di amplificazione.

4.1 Diluizione degli estratti di DNA del tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina

Il OncoMate™ MSI Dx Analysis System richiede un ingresso di dsDNA di 1,0 ng per reazione, erogato in un volume compreso tra 1 µl e 6 µl. Si consiglia di diluire il DNA in una concentrazione costante tra i campioni, in modo che a ogni reazione venga aggiunto 1 ng di DNA in un volume costante. Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, tutti i modelli di DNA sono stati diluiti a 0,5 ng/µl e a ciascuna reazione sono stati aggiunti 2 µl di DNA modello diluito.

Completare i seguenti passaggi di campioni di DNA che richiedono la diluizione prima dell'amplificazione:

1. Agitare il campione di DNA tre volte per 5 secondi, a velocità massima e centrifugare brevemente (da 1 a 2 secondi), se necessario, in una minicentrifuga per raccogliere il campione sul fondo della provetta.
Nota: se i campioni di DNA e le diluizioni non vengono mescolati adeguatamente possono verificarsi errore di quantificazione e prestazioni scarse dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.
2. Diluire il campione di DNA in acqua priva di nucleasi (N. cat. MC1191) a una concentrazione appropriata per consentire l'aggiunta di 1,0 ng di dsDNA a ciascuna reazione di amplificazione nel volume modello desiderato (vedere la Sezione 4.3). Per ottimizzare la precisione, quando si diluisce il DNA campione, pipettare volumi di ≥ 1 µl.

Nota: se è necessario diluire i campioni, utilizzare acqua priva di nucleasi. L'efficienza dell'amplificazione PCR può essere notevolmente alterata dalle modifiche nel pH (dovute all'aggiunta di Tris-HCl) o dalla concentrazione di magnesio disponibile (dovuta alla chelazione dell'EDTA) nella reazione di amplificazione quando si utilizzano diluenti con base Tris- o Tris-EDTA. se i campioni di DNA e le diluizioni non vengono mescolati adeguatamente possono verificarsi errore di quantificazione e prestazioni scarse dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Per ciascun esperimento, preparare delle diluizioni di DNA campione per ogni esperimento. La conservazione del DNA campione diluito per l'utilizzo futuro può essere causa di scarsa amplificazione e di problemi di test.

4.2 Diluizione del 2800M Control DNA


Il 2800M Control DNA serve da controllo dell'amplificazione positiva (Sezione 7.3), non da controllo MSI. OncoMate™ MSI Dx Analysis System è progettato per l'uso con un ingresso 2800M Control DNA di 1,0 ng, erogato in un volume compreso tra 1,0 µl e 6,0 µl. Prima dell'utilizzo, conservare il 2800M Control DNA, 10 ng/µl a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C per almeno 8 ore. È consigliabile diluire il DNA di controllo nella stessa concentrazione dei campioni di test. Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, il 2800M Control DNA è stato diluito a 0,5 ng/µl e a ciascuna reazione sono stati aggiunti 2 µl di DNA di controllo diluito.

1. Agitare 2800M Control DNA per tre volte per 10 secondi ciascuna alla massima velocità.
2. Diluire 2800M Control DNA in acqua priva di nucleasi (N. cat. MC1191) oppure acqua con grado di amplificazione, in modo da aggiungere alla reazione di controllo positiva venga aggiunto 1,0 ng nel volume desiderato (1–6 µl). Vedere la Tabella 2 per le diluizioni di esempio. Per garantire la precisione, quando si preparano diluizioni di 2800M Control DNA, pipettare volumi ≥ 1 µl.

Tabella 2. Diluizione di 2800M Control DNA.

Volume di campione di DNA per reazione	Volume di 2800M Control DNA (10 ng/µl)	Volume d'acqua ¹
1,0 µl	2,0 µl	18 µl
2,0 µl	2,0 µl	38 µl
3,0 µl	2,0 µl	58 µl
4,0 µl	2,0 µl	78 µl
5,0 µl	2,0 µl	98 µl
6,0 µl	2,0 µl	118 µl

¹Acqua priva di nucleasi o acqua con grado di amplificazione

 **Nota:** per ciascun esperimento, preparare una diluizione di 2800M Control DNA fresca. La conservazione del 2800M Control DNA diluito per l'utilizzo futuro può essere causa di scarsa amplificazione del controllo positivo e di problemi di test.

4.3 Preparazione delle reazioni di amplificazione OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1. Al primo utilizzo, scongelare completamente OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, OncoMate™ MSI 5X Master Mix e l'acqua con grado di amplificazione. Dopo il primo utilizzo, conservare i reagenti a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C per almeno 3 mesi.
2. Centrifugare le provette brevemente (1–2 secondi) in una minicentrifuga per portare il contenuto sul fondo e agitare i reagenti tre volte per 3 secondi ognuna alla massima velocità. Non centrifugare dopo averle agitate, in quanto i reagenti potrebbero formare un gradiente di concentrazione nella provetta.
3. Etichettare MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode.
4. Determinare il numero di reazioni da assemblare. Tale numero deve includere almeno una reazione di controllo di amplificazione positivo e una reazione di controllo di amplificazione negativo per ogni piastra elaborata. Aggiungere altre reazioni per compensare l'errore di pipettamento. Sebbene questo approccio consumi una piccola quantità di ciascun reagente, garantisce la disponibilità, per tutti i campioni, di una miscela di amplificazione PCR sufficiente.
5. Assemblare la miscela di amplificazione PCR come descritto nella Tabella 3. Aggiungere il volume finale di acqua con grado di amplificazione, OncoMate™ 5X Master Mix e OncoMate™ 5X Primer Mix a una provetta pulita da 1,5 ml. Il DNA campione sarà aggiunto singolarmente a ciascun pozzetto di reazione nel Passaggio 7.

Nota: nella tabella 3 si presume che il campione di DNA sia erogato alla reazione nel Passaggio 7 in un volume costante tra tutti i campioni.

Tabella 3. Assemblaggio della miscela di amplificazione PCR.

Componente della miscela di amplificazione PCR ¹	Volume per reazione	Numero di reazioni	Volume finale
Acqua con grado di amplificazione	a un volume finale di 10 µl	×	=
OncoMate™ MSI 5X Master Mix ²	2 µl	×	=
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	2 µl	×	=
DNA campione (1,0 ng)	fino a 6 µl		
Volume di reazione totale	10 µl		

¹Combinare acqua con grado di amplificazione, OncoMate™ 5X Master Mix e OncoMate™ 5X Primer Mix in una nuova provetta da 1,5 ml. Il DNA campione sarà aggiunto singolarmente a ciascun pozzetto di reazione nel Passaggio 7.

²È possibile che si verifichi la formazione di precipitato nell'OncoMate™ MSI 5X Master Mix. La presenza del precipitato non influirà sull'amplificazione del DNA quando si utilizza OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

6. Agitare la miscela di amplificazione PCR tre volte per 3 secondi ciascuna alla massima velocità, quindi pipettare una quantità di miscela di amplificazione PCR appropriata per una reazione in ciascun pozzetto della piastra di reazione utilizzata per campioni e controlli.

Nota: se non si riesce ad agitare a sufficienza la miscela di amplificazione PCR, l'amplificazione sarà scarsa o vi sarà uno squilibrio da marker a marker. Aggiungere la miscela di amplificazione PCR ai pozzetti della piastra di reazione appena viene preparata. Procedere subito con i Passaggi da 7 a 10, seguiti immediatamente dal ciclo termico.

7. Agitare il DNA campione fissato in formalina e incluso in paraffina (preparato nella Sezione 4.1) tre volte per 5 secondi ciascuna a velocità massima e centrifugare brevemente (da 1 a 2 secondi) in una minicentrifuga per raccogliere il liquido sul fondo della provetta. Pipettare 1,0 ng di campione nel pozzetto della piastra designato, contenente la miscela di amplificazione PCR. Mescolare pipettando più volte.
8. Agitare il 2800M Control DNA diluito (preparato nella Sezione 4.2) tre volte per 10 secondi ciascuna a velocità massima e centrifugare brevemente (da 1 a 2 secondi) in una minicentrifuga per raccogliere il liquido sul fondo della provetta. Pipettare 1,0 ng della diluizione di 2800M Control DNA nei pozzetti riservati alle reazioni di controllo positivo. Mescolare pipettando più volte.
9. Per il controllo di amplificazione negativo, pipettare un volume di acqua con grado di amplificazione, che è equivalente al volume di DNA campione nei pozzetti riservati per le reazioni di controllo negativo. Non aggiungere il DNA campione alle reazioni di controllo negativo. Mescolare pipettando più volte.
Nota: La mancata amplificazione e analisi delle reazioni di controllo negativo e positivo possono introdurre incertezza durante l'analisi dei dati dei risultati e complicare la risoluzione dei problemi. Le reazioni di controllo positivo e negativo devono essere incluse in ogni piastra.
10. Tappare i pozzetti con MicroAmp® 8-Cap Strips, e centrifugare brevemente in una minicentrifuga con piastre per portare il contenuto sul fondo dei pozzetti e rimuovere le bolle d'aria.

4.4 Termociclazione

1. Accertarsi che il coperchio riscaldato abbia raggiunto la temperatura programmata (103–105°C) e posizionare la piastra di reazione in un termociclatore. Chiudere il termociclatore.
2. Programmare il termociclatore seguendo le istruzioni del produttore per eseguire il protocollo specificato nella Figura 4. Accertarsi che il volume della reazione sia impostato su 10 µl. Il tempo di ciclo totale, incluso il ramping è di circa 1 ora e 15 minuti.

Protocollo di termociclazione¹

96°C per 1 minuto, quindi:

96°C per 10 secondi

58°C per 1 minuto

72°C per 30 secondi

per 29 cicli, quindi:

60°C per 10 minuti, quindi:

conservazione a 4°C

¹Volume di reazione: 10 µl; Coperchio riscaldato:
tra 103° e 105°C

Figura 4. Protocollo di termociclazione per OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3. Dopo il completamento del protocollo di termociclazione, procedere con l'analisi dei frammenti mediante elettroforesi capillare o conservare i prodotti dell'amplificazione protetti dalla luce per una notte a una temperatura compresa tra 2°C e 10°C o a lungo termine a una temperatura compresa tra –30°C e –10°C.



Nota: la conservazione a lungo termine dei campioni amplificati a temperature superiori a –10°C può produrre artefatti che interferiscono con l'analisi dei dati.

4.5 Preparazione dello strumento per l'elettroforesi capillare



Per i requisiti degli strumenti per l'elettroforesi capillare, vedere la Sezione 3.6. Seguire le istruzioni del produttore per il funzionamento e la manutenzione dello strumento per l'elettroforesi capillare selezionato e l'utilizzo delle matrici di polimeri e capillari associate.

1. Accertarsi che il polimero e i tamponi dello strumento non siano scaduti e che sia disponibile un numero di campioni o iniezioni sufficienti per completare l'analisi pianificata.
2. Se applicabile, preriscaldare i forni per l'elettroforesi secondo le istruzioni del produttore per almeno 30 minuti prima di iniziare un ciclo.

4.6 Preparazione dei frammenti amplificati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System per l'elettroforesi capillare

1. Se i campioni amplificati sono stati conservati a una temperatura compresa tra -30°C e -10°C , scongelarli completamente prima di procedere. Agitare per 5 secondi e centrifugare la piastra da 5 a 10 secondi in una minicentrifuga con piastre per raccogliere il contenuto sul fondo dei pozzetti.
2. Determinare il numero di pozzetti richiesti per analizzare tutti i campioni amplificati, incluse le reazioni di controllo positive e negative. Aggiungere a questo numero tutti i pozzetti inutilizzati da cui verrà avviata un'iniezione più altri pozzetti per compensare l'errore di pipettamento.
3. Agitare Size Standard 500 tre volte per 3 secondi ciascuna alla massima velocità e preparare il cocktail di caricamento per l'elettroforesi capillare come indicato nella Tabella 4.



Nota: la formammide è una sostanza irritante e teratogena. Evitare l'inalazione e il contatto con la cute. Leggere l'etichetta di avvertenza e applicare le precauzioni appropriate nel maneggiare questa sostanza. Indossare sempre guanti e occhiali di sicurezza quando si lavora con la formammide.

Tabella 4. Preparazione del cocktail di caricamento per l'elettroforesi capillare.

Cocktail di caricamento	Volume per pozzetto	×	Numero di pozzetti	=	Volume finale
Hi-Di™ Formamide	9,5 µl	×		=	
Size Standard 500	0,5 µl	×		=	
Volume totale	10 µl				

4. Agitare il cocktail di caricamento tre volte per 3 secondi ciascuna, a velocità massima e centrifugare brevemente (da 1 a 2 secondi) in una minicentrifuga per raccogliere i reagenti sul fondo della provetta.
5. Pipettare 10 µl di cocktail di caricamento in ciascun pozzetto richiesto di un MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate con lo strumento per l'elettroforesi capillare selezionato.

Nota: il cocktail di caricamento o la Hi-Di™ Formamide deve essere aggiunta a ogni pozzetto dal quale viene avviata un'iniezione, a prescindere che al pozzetto siano stati aggiunti anche i prodotti amplificati. La mancata aggiunta del cocktail di caricamento o della Hi-Di™ Formamide a un pozzetto iniettato può causare danni alla matrice capillare e la mancata riuscita del ciclo.

6. Aggiungere 1 µl di campione amplificato o di reazione di controllo a ciascun pozzetto designato.
7. Coprire i pozzetti con i setti in base alle istruzioni del produttore dello strumento.
8. Centrifugare la piastra per 5 - 10 secondi, per portare la miscela di formammide-campione sul fondo di ciascun pozzetto e rimuovere le bolle d'aria.
9. Denaturare i campioni a 95°C per 3 minuti in un termociclatore, quindi raffreddare immediatamente la piastra di reazione sul ghiaccio tritato per almeno 3 minuti. Denaturare i campioni appena prima di caricare la piastra sullo strumento per l'elettroforesi capillare.
Nota: non chiudere il coperchio riscaldato del termociclatore, in quanto il setto della piastra potrebbe fondersi.
10. Caricare la piastra sullo strumento per l'elettroforesi capillare secondo le istruzioni del produttore. Se applicabile, accertarsi che il forno abbia raggiunto la temperatura richiesta prima del caricamento.

4.7 Rilevamento dei frammenti amplificati mediante elettroforesi capillare con rilevamento della fluorescenza

Consultare il manuale tecnico dello strumento per elettroforesi capillare selezionato per informazioni sul completamento di un ciclo di analisi dei frammenti, incluso come configurare i metodi di calibrazione spettrale e di analisi dei frammenti, sull'aggiunta di informazioni per i campioni, sul caricamento dei campioni denaturati sullo strumento, sull'avviamento di un ciclo e sul recupero dei dati per un ciclo completato. Nel programmare lo strumento, partire con il metodo di analisi dei frammenti predefinito per la configurazione dello strumento specifico. Per soddisfare le esigenze del singolo laboratorio, può essere necessario ottimizzare il tempo di iniezione. È responsabilità dell'utente accertarsi che le condizioni selezionate per l'elettroforesi capillare siano compatibili con il test. Contattare la filiale o il distributore Promega locale o inviare un'e-mail a genetic@promega.com per ulteriori informazioni.

5. Analisi dei dati

5.1 Introduzione

L'elettroforesi capillare dei prodotti di amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System genera file di dati (.fsa) che richiedono l'analisi a valle tramite il software di analisi dei frammenti (Figura 5). Gli obiettivi di analisi dei dati consistono nel fornire informazioni di base sulla qualità dei dati, dimensionare i picchi dei frammenti nell'intervallo di analisi dei dati definito, assistere nel filtraggio dei picchi "stutter" dai picchi di allele presenti in ogni marker e riepilogare le dimensioni degli alleli per marker per l'interpretazione dei risultati a valle. Effettuare i seguenti passaggi per analizzare i dati dell'elettroforesi capillare utilizzando il software di analisi dei frammenti:

Completare una sola volta, prima della prima analisi; vedere l'Appendice C (Sezione 11.3) per le istruzioni:

- Definire le dimensioni note per i frammenti di dimensioni standard (vale a dire, creare o importare lo standard di dimensioni del test)
- Assegnare l'intervallo di dimensione dell'analisi per ciascun marker (vale a dire, creare o importare i pannelli del test)
- Impostare i parametri di analisi (vale a dire, creare o importare il metodo di analisi)
- Facoltativo: gestire la visualizzazione dei dati (vale a dire, creare o importare le impostazioni relative a tabella, grafico e report)

Completare per ciascun batch di campioni analizzato; per le istruzioni, vedere la Sezione 5.2:

- Importare i file di dati
- Selezionare gli input di test (vale a dire, standard di dimensioni del test, pannelli di test e metodo di analisi)
- Eseguire l'analisi dei dati
- Riepilogare le dimensioni degli alleli per marker

Per valutare le prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stato utilizzato il GeneMapper® Software. Le impostazioni di analisi dei dati finale utilizzate durante la valutazione delle prestazioni del test vengono fornite come riferimento nell'Appendice C (Sezione 11.3). Tali impostazioni sono state ottimizzate per identificare il più piccolo (in bp) allele distinto in ciascun marker con ripetizione del mononucleotide e distinguerlo dai picchi di frammenti per l'analisi a valle. In specifiche circostanze, gli alleli distinti possono essere filtrati quando si utilizzano le impostazioni di analisi consigliate. Tali alleli filtrati non vengono utilizzati per determinare la stabilità dei marker (vedere la Sezione 6.4), in quanto non si tratta dell'allele distinto più piccolo per quel marker. Il flusso di lavoro per analizzare i dati dei frammenti è illustrato nella Figura 5 e descritto di seguito nella Sezione 5.2 utilizzando GeneMapper® Software come esempio. Per ulteriori informazioni sui dati di analisi dei frammenti con GeneMapper® Software, consultare la guida utente per *l'analisi dei frammenti di DNA mediante elettroforesi capillare* di Thermo Fisher Scientific.



Note:




1. Le impostazioni relative ai metodi di analisi e ai pannelli sono state determinate per OncoMate™ MSI Dx Analysis System utilizzando i dati generati con un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con il POP-7® Polymer e una matrice di 50 cm. L'analisi dei dati acquisiti utilizzando configurazioni diverse dello strumento per l'elettroforesi dei capillari può richiedere file dei metodi di pannello e di analisi modificati. Per assistenza, contattare la filiale o il distributore Promega locale o inviare un'e-mail a genetic@promega.com
2. Le impostazioni del metodo di analisi mostrate nell'Appendice C possono servire come modello per sviluppare le impostazioni di analisi per il sistema di elettroforesi capillare in uso. Tuttavia, è necessario stabilire le soglie analitiche ("Peak Amplitude Thresholds" (Soglie di ampiezza dei picchi) nella scheda "Peak Detector" (Strumento di rilevamento picchi) dell'"Analysis Method Editor" (Editor dei metodi di analisi) GeneMapper®) dal singolo laboratorio sulla base dell'intensità del picco di campione utilizzato come bersaglio, del range dinamico dello strumento e del rumore o del segnale di sfondo osservato nei dati analizzati (fare riferimento alla Sezione 7.5). Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stata impiegata una soglia analitica di 175 RFU per ciascun canale di colore (B, G, Y, O). Le soglie analitiche per la strumentazione per l'elettroforesi capillare indicata in genere sono tra 50 RFU e 200 RFU. Per una spiegazione dell'utilizzo corretto e dell'effetto delle diverse impostazioni di analisi, consultare la guida utente per *l'analisi dei frammenti di DNA mediante elettroforesi capillare* di Thermo Fisher Scientific.



Figura 5. Flusso di lavoro dell'analisi per i dati dell'elettroforesi capillare dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.


5.2 Analisi dei dati

Le istruzioni per l'analisi dei dati con GeneMapper® Software vengono fornite qui per comodità. Tali istruzioni presumono che siano stati importati i file delle impostazioni GeneMapper® disponibili descritti nell'Appendice C (Sezione 11.3) o che siano stati creati file di impostazioni simili. Quando si utilizzano altri software per l'analisi dei dati, fare riferimento alla guida per l'utente corrispondente per le informazioni e le istruzioni.

1. Aprire il GeneMapper® Software, versione 5.0 o 6.0.
2. Selezionare l'icona "New Project" (Nuovo progetto) () dalla barra degli strumenti e scegliere **Microsatellite** come tipo di progetto.
3. Importare i dati selezionando l'icona "Add Samples To Project" (Aggiungi campioni al progetto) () dalla barra degli strumenti.
4. Nel menu a discesa "Table Setting" (Impostazione tabella) della barra degli strumenti, selezionare **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Tabella_v1.0).
5. Se il campo "Sample Type" (Tipo di campione) non è popolato, scegliere **Sample** (Campione), **Positive Control** (Controllo positivo) o **Negative Control** (Controllo negativo) per descrivere ciascun campione.
6. Per tutti i campioni di controllo o paziente, selezionare **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Analisi_v1.0) per "Analysis Method" (Metodo di analisi), **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Pannelli_v1.0) per "Panel" (Pannello) e **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Dimensioni_v1.0) per "Size Standard" (Standard di dimensioni).
7. Selezionare l'icona "Analyze" (Analizza) () dalla barra degli strumenti per analizzare tutti i campioni. Quando richiesto, fornire un nome descrittivo per il progetto nella finestra a comparsa "Save Project" (Salva progetto) e selezionare **OK**.

Nota: dopo l'analisi, i campioni possono essere ordinati utilizzando l'opzione **Sort...** (Ordina) nel menu **Edit** (Modifica) (ad esempio per **Sample Type** (Tipo di campione) e **Sample Name** (Nome campione)).





Se i campioni vengono riordinati in modo che ciascuna coppia di campione normale e tumorale risulti adiacente nell'elenco dei campioni sarà più semplice visualizzare e rivedere i campioni quando si utilizza il file "Plot Settings" (Impostazioni grafico) (vedere il Passaggio 8). L'ordine può essere utilizzato anche per assicurare che gli elettroferogrammi per la coppia di campione normale e tumorale vengano stampati nella stessa pagina (vedere il Passaggio 9c).

8. Rivedere i campioni di controllo e paziente per la qualità, come descritto nella Sezione 6.3. Selezionare le righe contenenti i campioni di controllo o paziente e scegliere l'icona "Display Plots" (Mostra grafici) () dalla barra degli strumenti per visualizzare i dati degli elettroferogrammi e degli alleli tabulati. Nel menu a discesa "Plot Setting" (Impostazioni grafici) della barra degli strumenti, selezionare **OncoMate_MSI_Dx_Plot_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Grafici_v1.0).


Nota: la verifica degli elettroferogrammi campione è necessaria per valutare la qualità dei dati. È consigliabile rivedere dapprima i campioni di controllo seguiti dai campioni paziente. I campioni di controllo selezionati insieme ai campioni paziente saranno visualizzati continuamente nella finestra "Samples Plot" (Grafico dei campioni) e non possono essere ridotti a icona, per cui affolleranno lo schermo.

9. Rivedere i campioni paziente validi per lo stato di instabilità dei microsatelliti come descritto nelle Sezioni 6.4 e 6.5. Visualizzare i dati dei campioni come descritto nel Passaggio 8. Per facilitar l'interpretazione dei dati, i dati di dimensionamento possono essere esportati per l'analisi a valle in diversi modi, tra cui quelli descritti qui.

Nota: queste opzioni di esportazione dei dati vengono fornite solo a scopo informativo. È responsabilità del laboratorio eseguire il test per stabilire il formato di dati più indicato da utilizzare per la determinazione dello stato di instabilità dei microsatelliti. Per assistenza nello sviluppo di un metodo di creazione dei report, contattare la filiale o il distributore Promega locale o inviare un'e-mail a genetic@promega.com

- a. Un file di testo con tutte le dimensioni di allele filtrate e altri dati campione può essere esportato come "Genotypes Table" (Tabella dei genotipi) come indicato di seguito:
 - i. Dalla schermata principale, selezionare uno o più campioni paziente o di controllo e scegliere l'icona "Display Plots" (Mostra grafici) () dalla barra degli strumenti per aprire la finestra "Samples Plot" (Grafico dei campioni).
 - ii. Se la "Genotypes Table" (Tabella dei genotipi) non viene visualizzata sotto gli elettroferogrammi, selezionare la relativa icona () dalla barra degli strumenti.
 - iii. Selezionare **Export Table** (Esporta tabella) dal menu **File** e salvare il file per l'analisi a valle.
- b. Un file di testo con tutte le dimensioni di allele filtrate e altri dati campione può essere esportato come "Report" nel modo seguente:
 - i. Dalla schermata principale, selezionare uno o più campioni paziente e di controllo, quindi selezionare l'icona "Report Manager" (Gestione report) () dalla barra degli strumenti per aprire la finestra "Report Manager" (Gestione report).
 - ii. Nel menu a discesa "Report Setting" (Impostazione report) della barra degli strumenti, selezionare **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0**.
 - iii. Selezionare **Export...** (Esporta...) dal menu **File**, dare un nome al file e selezionare **Export** (Esporta).
- c. Un riepilogo dati in formato .pdf che visualizza gli elettroferogrammi e le dimensioni di allele tabulate può essere salvato come indicato di seguito:
 - i. Dalla schermata principale, selezionare uno o più campioni paziente e di controllo, quindi scegliere l'icona "Display Plots" (Mostra grafici) () per aprire la finestra "Samples Plot" (Mostra grafici).
 - ii. Selezionare **Print...** (Stampa...) dal menu **File**. Scegliere **Microsoft Print to PDF** (Stampa Microsoft su PDF) (o equivalente) come "Print Service" (Servizio di stampa) e **Landscape** (Verticale) come orientamento. Selezionare **Print** (Stampa) e fornire un nome per il file .pdf risultante.

Nota: sono disponibili diversi dati di campi per l'esportazione, come "Genotypes Table" (Tabella dei genotipi) piuttosto che "Report". È possibile aggiungere dei campi per soddisfare specifiche esigenze di laboratorio modificando i file "Table Settings" (Impostazioni tabella) o "Report Settings" (Impostazioni report) OncoMate™ in GeneMapper® Manager.

- c. Un riepilogo dati in formato .pdf che visualizza gli elettroferogrammi e le dimensioni di allele tabulate può essere salvato come indicato di seguito:
 - i. Dalla schermata principale, selezionare uno o più campioni paziente e di controllo, quindi scegliere l'icona "Display Plots" (Mostra grafici) () per aprire la finestra "Samples Plot" (Mostra grafici).
 - ii. Selezionare **Print...** (Stampa...) dal menu **File**. Scegliere **Microsoft Print to PDF** (Stampa Microsoft su PDF) (o equivalente) come "Print Service" (Servizio di stampa) e **Landscape** (Verticale) come orientamento. Selezionare **Print** (Stampa) e fornire un nome per il file .pdf risultante.

Nota: durante questo processo possono essere generati più file .pdf, che richiedono nomi file diversi. Per questa ragione, i laboratori possono scegliere di salvare un file .pdf distinto per ciascuna coppia di campioni.

6. Esame e interpretazione dei risultati

In questa sezione vengono esaminate le considerazioni per la valutazione della qualità dei dati e l'interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti per i campioni analizzati utilizzando OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Il software di analisi dei frammenti può fornire più opzioni per la visualizzazione e l'esame dei dati. Ad esempio, GeneMapper® Software offre una varietà di opzioni per visualizzare e riepilogare i dati dei campioni. Per ulteriori informazioni sui dati di esame, consultare la guida utente per *l'analisi dei frammenti di DNA mediante elettroforesi capillare* di Thermo Fisher Scientific.

6.1 Comprendere i dati di OncoMate™ MSI Dx Analysis System

L'analisi dei prodotti PCR di OncoMate™ MSI Dx Analysis System PCR genera dati di lunghezza dei frammenti di DNA per ciascuna delle aree dei microsatelliti amplificate. I dati di una coppia di campione normale e tumorale vengono interpretati valutando i cinque marker di ripetizione del mononucleotide: (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27) e i due marker di ripetizione del pentanucleotide (Penta C e Penta D) amplificati mediante l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

I marker di ripetizione del mononucleotide vengono analizzati per determinare lo stato di instabilità dei microsatelliti del paziente. L'amplificazione dei marker di ripetizione del mononucleotide mediante PCR produce un picco dell'allele principale e una distribuzione quasi a campana dei picchi "stutter" affiancati, ciascuno separato mediante 1 bp (Bacher, 2004). All'interno di una singola distribuzione di picchi stutter, il picco con il valore di fluorescenza più elevato è il picco dell'allele (Figura 6). Per i campioni di tessuto normale (se eterozigote) e tumorale (se eterozigote o instabile) possono essere presenti più distribuzioni di picchi stutter e di alleli per ciascun marker. Il software di analisi dei frammenti, ad esempio GeneMapper® Software, utilizza algoritmi di filtraggio dei picchi per isolare gli alleli presenti in ciascun marker dai picchi "stutter". Le dimensioni di questi alleli sono visualizzate su un elettroferogramma e inserite in una tabella per l'interpretazione a valle dell'instabilità dei microsatelliti.

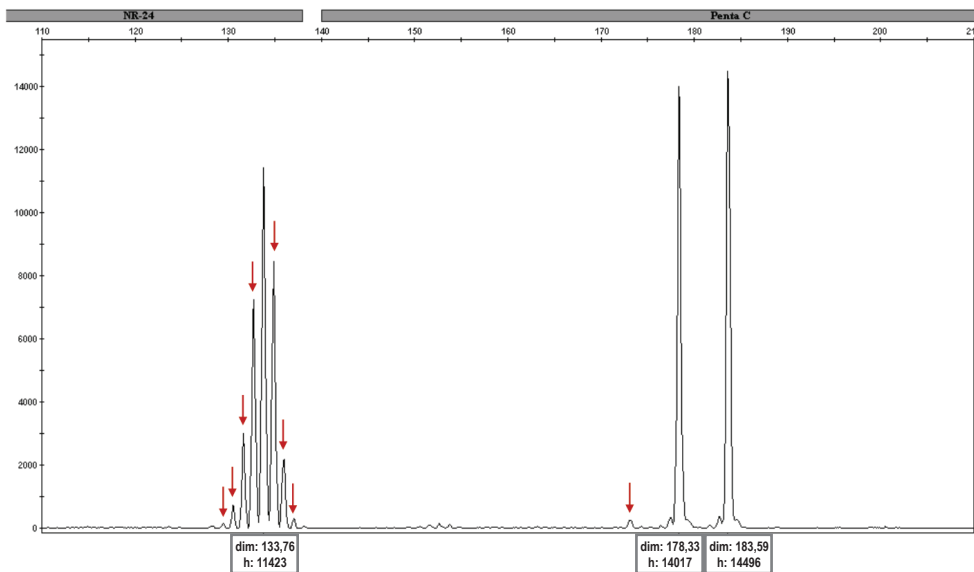


Figura 6. I picchi stutter (indicati dalle frecce) e generati dallo slittamento della polimerasi durante l'amplificazione PCR delle ripetizioni brevi in tandem sono chiaramente visibili nei marker mononucleotide a intervalli di 1 bp dal picco originale, più alto o dal picco dell'allele, qui rappresentato mediante il marker NR-24 (a sinistra). È inoltre possibile osservare picchi stutter molto più piccoli in corrispondenza dei marker pentanucleotide, a 5 bp dai picchi dell'allele originale, qui rappresentati mediante il marker Penta C.

Quando un marker in un campione tumorale è instabile, vengono rilevati uno o più nuovi alleli diversi da quelli normali (Figura 7). Confrontando i dati del campione tumorale rispetto al relativo campione normale, si rileva una differenza nella dimensione degli alleli. I campioni tumorali sono classificati come MSI-H quando $\geq 40\%$ dei marker di ripetizione del mononucleotide mostrano nuovi alleli (ad esempio, quando ≥ 2 di 5 marker mostrano "profili con alleli alterati"). Campioni tumorali con meno di due marker di ripetizione del mononucleotide alterati possono essere classificati come MSS (Umar, 2004; Boland, 1998).

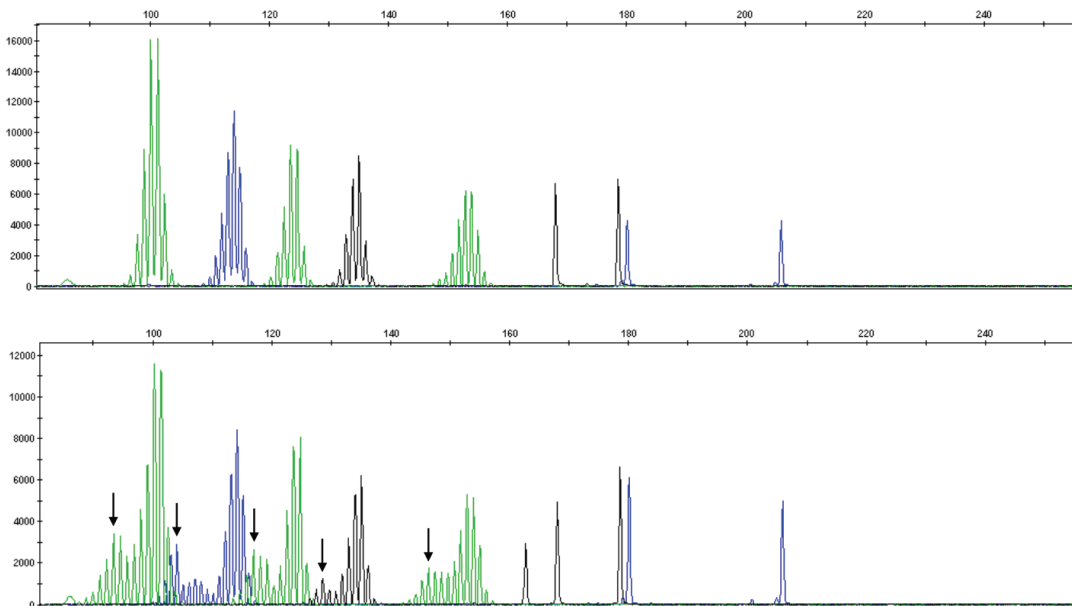


Figura 7. I campioni paziente normali (pannello in alto) e tumorali (pannello in basso) sono stati analizzati utilizzando OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Un nanogrammo di DNA è stato amplificato e analizzato mediante un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con il POP-7® Polymer e una matrice capillare di 50 cm. La presenza di nuovi alleli nel campione tumorale (indicati dalle frecce), assenti nel campione di riferimento normale indica l'instabilità dei marker. L'esempio mostrato è MSI-H, in quanto ≥ 2 marker di ripetizione del mononucleotide: mostrano instabilità.

6.2 Riepiloghi degli artefatti di amplificazione noti e delle anomalie nell'elettroforesi capillare

Quando si utilizzano il POP-7® Polymer e una matrice capillare di 50 per l'elettroforesi, all'interno del marker NR-21 viene osservato un artefatto di amplificazione noto come picchi ampio singolo, nell'intervallo di misurazione da 83 bp a 90 bp circa (Figura 8). Tale picco non deve essere considerato come un allele quando si determina la stabilità del marker NR-21. La presenza di picchi di n- 1 bp a bassa intensità è comune per i marker di ripetizione pentanucleotide Penta D e Penta C.

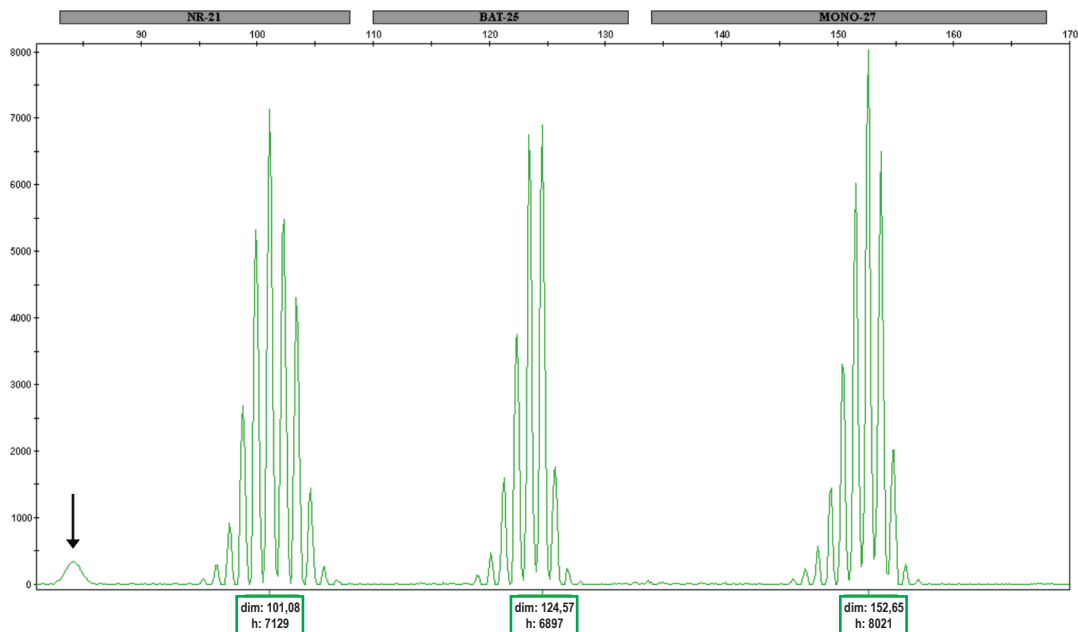


Figura 8. Un artefatto di amplificazione (indicato con una freccia) può essere osservato all'interno del marker NR-21 come picco ampio singolo nell'intervallo di dimensioni compreso tra 83 bp e circa 90 bp. Tale picco non deve essere considerato come un allele quando si determina la stabilità del marker NR-21.

Altri artefatti di amplificazione possono verificarsi quando come ingresso per l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System si utilizza una quantità eccessiva di DNA. Il segnale della linea di base nel marker BAT-26 (canale blu) può diventare elevato e frastagliato. Eccetto che per gli ingressi estremi (ad esempio, ≥ 4 ng 2800M Control DNA), l'adozione dei parametri di filtraggio dei picchi suggeriti per l'analisi GeneMapper® (vedere l'Appendice C) filtrerà questi artefatti durante l'identificazione (vale a dire, la denominazione) degli alleli per il marker BAT-26.

Altre anomalie note, ma casuali, possono essere osservate durante l'elettroforesi capillare. Predominano tre di queste anomalie rare: iniezioni non riuscite, picchi ampi e picchi di segnale.

- a. In caso di iniezioni non riuscite, all'interno della matrice capillare viene iniettata una quantità minima o addirittura nulla di DNA campione. In questi casi, verrà osservato un problema di QC di Sizing Quality (vedere la Tabella 5) dovuto alla mancanza (o alla scarsa qualità) dei picchi di Size Standard 500. Sizing Quality è una funzionalità di GeneMapper® Software in cui viene calcolato un punteggio sulla base della forma del picco, sulla corrispondenza delle dimensioni e sulla curva di taratura. L'impostazione si trova nel metodo di analisi.
- b. Durante l'elettroforesi capillare può essere rilevato un picco che mostra una morfologia ampia (vale a dire non appuntita). Un picco di questo tipo si origina dai cristalli o da altro materiale aberrante che migra attraverso la matrice capillare.
- c. Un "picco" di segnale può essere osservato durante l'elettroforesi capillare in forma di picco di larghezza prossima allo zero che si estende in tutti i canali di colore. Tali picchi vengono rilevati e ignorati dalla maggior parte dei software di analisi dei frammenti durante l'identificazione degli alleli.

6.3 Requisiti di controllo qualità per l'interpretazione dei dati

Conoscere la qualità dei dati di OncoMate™ MSI Dx Analysis System è fondamentale per la corretta interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti del paziente. È necessario disporre di una serie di controlli (positivi e negativi) del test per avere la certezza dei dati acquisiti con questa analisi e utilizzati per l'interpretazione dell'instabilità di microsatelliti (Sezione 7). Prima che venga determinato lo stato di instabilità dei microsatelliti di un campione, viene eseguita una serie di controlli di qualità (QC) dei dati per stabilire la fiducia dell'utente nei confronti rispetto alla qualità dei dati (Tabella 5). La maggior parte di controlli di qualità descritti di seguito richiede l'ispezione visiva degli elettroferogrammi campione; una valutazione della sola tabella degli alleli di un determinato lotto di campioni non è sufficiente per accertare la qualità dei dati.

I tipi di campione valutati per ciascun controllo di qualità e l'impatto della mancata riuscita di un controllo di qualità vengono forniti nella Tabella 5. A seguito di una valutazione dei controlli di qualità dei dati, ciascun campione paziente avrà uno stato "Non valido" a indicare l'impossibilità di interpretare l'instabilità dei microsatelliti a causa di un errore critico dei controlli di qualità dei dati, oppure "Valido", a indicare che non è stato osservato alcun errore critico del controllo di qualità o che, a dispetto di un errore di controllo della qualità, è comunque possibile interpretare lo stato di instabilità dei microsatelliti del paziente sulla base delle indicazioni fornite nella Sezione 6.5.3. Se un campione di controllo non supera determinate verifiche QC dei dati, la qualità di tutti i campioni paziente associati può essere compromessa e il risultato "Non valido" si applica a tutti i campioni del lotto. Quando i controlli negativi e positivi hanno superato tutti i test QC, un campione paziente può superare o meno i test di QC dei dati a seconda del singolo campione. Lo stato del campione paziente associato un errore di QC si basa sull'eventualità che l'errore sia osservato per un controllo di amplificazione positivo o negativo o per il campione paziente. I campioni che non soddisfano i requisiti di QC possono essere indirizzati in base alle istruzioni fornite nella sezione Risoluzione dei problemi del presente manuale tecnico. Di seguito viene fornita una sequenza di controllo della qualità dei dati consigliata:

1. Valutare la qualità del dimensionamento di tutti i campioni di controllo e paziente
2. Valutare i controlli dei lotti (vale a dire, i controlli di amplificazione positivi e negativi)
3. Valutare i campioni paziente

Tabella 5. Test di controllo della qualità dei dati da completare prima dell'interpretazione dell'instabilità dei microsatelliti per comprendere la qualità dei dati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Sezione	Test QC	Descrizione del test QC	Campioni valutati ¹	Stato del campione paziente quando un campione di controllo o un campione paziente non supera il test QC corrispondente	
				Il campione di controllo non supera il QC ²	Il campione paziente non supera il QC ³
6.3.1	QC della qualità di dimensionamento	Viene calcolato un punteggio sulla base della forma del picco, sulla corrispondenza delle dimensioni e sulla curva di taratura.	+, -, N, T	Tutti i campioni non validi	Campione non valido
6.3.2	QC controllo negativo	Per il controllo di amplificazione negativo non devono essere rilevati picchi al di sopra della soglia analitica.	-	Tutti i campioni non validi	Campioni paziente non valutati
6.3.3	QC dell'identità del controllo positivo	Per il controllo di amplificazione positivo, gli alleli presenti nei marker pentanucleotide devono corrispondere agli alleli previsti per il 2800M Control DNA all'interno di 1,5 coppie di basi.	+	Tutti i campioni non validi	Campioni paziente non valutati
6.3.4	QC picchi fuori scala	L'intensità (RFU) dei picchi in un dato campione non deve superare l'intervallo massimo rilevabile dello strumento per l'elettroforesi capillare.	+, N, T	Tutti i campioni non validi	Campione non valido
6.3.5	QC pull-up spettrale	I picchi allineati in base alla lunghezza in canali di colorante separati vengono valutati per il pull-up spettrale (vale a dire, il bleedthrough del segnale tra due canali di colorante).	+, N, T	Tutti i campioni non validi	Campione non valido
6.3.6	QC picco ampio	La larghezza dei picchi non deve superare il valore assegnato per l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti.	+, N, T	Vedere la nota a piè di pagina 4	Vedere la nota a piè di pagina 4

6.3.7	QC amplificazione degli alleli	All'interno di ciascun marker deve essere presente almeno un allele al di sopra della soglia analitica.	+, N, T	Tutti i campioni non validi	Marker non valido; il campione deve essere interpretato
6.3.8	QC contaminazione DNA	Per ciascun marker pentanucleotide, non possono essere presenti più di due alleli nel campione normale.	+, N	Tutti i campioni non validi	Campione non valido
6.3.9	QC identità campioni paziente	Per ciascun marker pentanucleotide, gli alleli identificati nel campione normale devono essere presenti nel campione tumorale (entro 1,5 coppie di base).	T	Controlli non valutati	Vedere la nota a piè di pagina 5
6.3.10	QC segnale tumorale	Per i marker mononucleotide che sono stati interpretati come stabili, le altezze dei picchi di allele nel campione tumorale devono essere sufficienti a garantire la sensibilità del test. L'intensità di picco richiesta si basa sulla soglia analitica e sul contenuto tumorale del campione.	T	Controlli non valutati	Marker non valido; il campione deve essere interpretato

¹ N, campione normale; T, campione tumorale; +, controllo positivo; -, controllo negativo

² Risultato dell'interpretazione dell'instabilità dei microsatelliti per tutti i campioni paziente del lotto quando un campione di controllo mostra il problema QC associato.

³ La colonna indica se i campioni paziente sono invalidi o possono comunque essere interpretati quando interessati dal problema QC associato a dispetto del problema di un particolare marker. L'indicazione fornita richiede che i campioni di controllo abbiano superato tutti i test QC. Vedere le linee guida dell'interpretazione nella Sezione 6.5.

⁴ Riconoscere l'artefatto di picco ampio noto tra 83 bp e 90 bp in NR-21 durante la valutazione QC dei dati come non correlata all'instabilità. Tutti i campioni devono essere interpretati come non validi se un campione di controllo mostra un picco ampio diverso dall'artefatto NR-21 noto e i marker interessati devono essere interpretati come non validi se il picco ampio diverso dall'artefatto NR-21 noto viene osservato in un campione paziente.

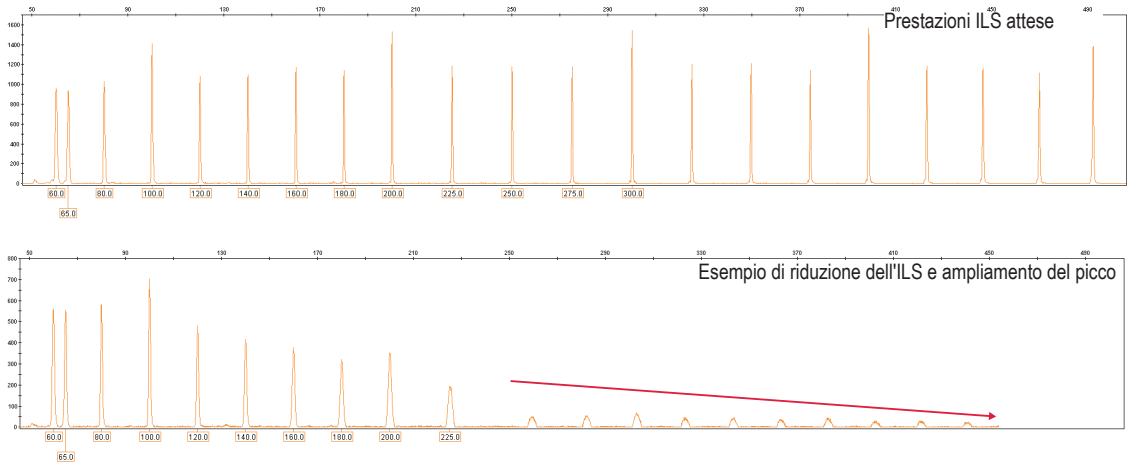
⁵ Se il QC dell'identità dei campioni paziente non viene superato a causa dell'assenza di un allele, il campione può essere interpretabile in base alle indicazioni fornite nella Sezione 6.5.3. In caso contrario, il campione non è valido.

6.3.1 Valutazione di tutti i campioni per Sizing Quality (QC Sizing Quality)

La metrica della qualità di dimensionamento può essere fornita dagli strumenti per l'elettroforesi capillare e/o visualizzata nel software di analisi dei frammenti. Di solito, i problemi di qualità di dimensionamento sono associati a un errore di analisi dell'elettroforesi capillare e si verificano per singolo capillare (vale a dire, non per tutti i capillari di un'iniezione). I campioni che mostrano problemi di Sizing Quality non visualizzeranno alcun picco di frammento (o ne visualizzeranno pochi) o picco di frammento che si amplia (vale a dire, perdita di risoluzione) con l'aumentare delle dimensioni (Figura 9). Valutare la qualità di dimensionamento di ogni campione e controllo analizzato in quanto le informazioni sul dimensionamento sono fondamentali per il risultato del test.

Per valutare la qualità di dimensionamento, accertarsi che nel software di analisi dei frammenti si visualizzato il canale di colorante Size Standard 500 (arancione) e che dimostri i profili di picco attesi per i frammenti standard da 60 bp a 300 bp. Il risultato di un campione paziente o di un campione di controllo non è valido se viene identificato uno dei seguenti attributi che indicano scarsa qualità di dimensionamento:

- a. La raccolta dati dell'elettroforesi capillare o il software di analisi dei frammenti ha restituito un flag di qualità di dimensionamento.
Nota: per i marker MSI di dimensionamento si utilizzano solo frammenti Size Standard 500 da 60 bp a 300 bp. I problemi di qualità apparenti per picchi Size Standard 500 maggiori di 300 bp non influiscono sul dimensionamento dei frammenti.
- b. Uno o più di 13 frammenti Size Standard 500 da 60 bp a 300 bp non sono etichettati o hanno un'etichetta errata (60 bp, 65 bp, 80 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp e 300 bp). Ciò può verificarsi a causa di una forte riduzione da picco a picco o l'ampliamento di un picco entro la dimensione standard. A volte, durante l'elettroforesi capillare possono essere rilevati dei picchi aberranti che potrebbero causare la mancata identificazione di picchi di dimensione standard.
Nota: i "picchi" di elettroforesi capillare (ad esempio, i picchi di larghezza zero) possono essere presenti ma non interferiranno con il dimensionamento dei frammenti a meno che non vengano etichettati in modo erraneo come picchi di dimensione standard dal software di analisi dei frammenti.



16185TA

Figura 9. Il pannello superiore mostra il risultato previsto per lo Size Standard 500. Nel pannello inferiore, sono stati osservati una riduzione estrema e l'ampliamento del picco, a indicare un problema di Sizing Quality.

6.3.2 Valutazione della reazione di controllo negativo per l'amplificazione (QC controllo negativo)

Un controllo di amplificazione negativo deve essere analizzato insieme ai campioni paziente. I picchi di frammenti rilevati al di sopra della soglia analitica nei canali di colorante campione (blu, verde e giallo/nero) per il controllo di amplificazione negativa indicano la possibilità che si sia verificata la contaminazione. Un controllo negativo contaminato indicherebbe problemi potenziali di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni. Pertanto, tutti i campioni paziente di un lotto con un campione di controllo negativo non riuscito dovrebbero essere considerati non validi.

6.3.3 Valutazione dei marker di ripetizione del pentanucleotide per la reazione di controllo positivo per l'identità (QC identità controllo positivo)

Un campione di controllo dell'amplificazione positivo, preparato con 2800M Control DNA, deve essere analizzato insieme ai campioni paziente per fornire prova di integrità del test (vale a dire che sono stati osservati i risultati previsti). Il QC identità controllo positivo viene valutato utilizzando i marker Penta D e Penta C. Il campione di controllo dell'amplificazione positivo mostra due alleli in ciascun marker di ripetizione del pentanucleotide, che vengono rilevati entro i seguenti intervalli di dimensione (bp) in base ai nostri dati di valutazione delle prestazioni (condizioni elencate nelle Appendici B e C):

- a. Penta D: 193,5 – 196,5 e 199 – 202
- b. Penta C: 176,5 – 179,5 e 182 – 185

Se il controllo positivo non soddisfa questi criteri possono sussistere problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni. Pertanto, tutti i campioni paziente analizzati in un lotto con un campione di controllo positivo non riuscito dovrebbero essere considerati non validi.

6.3.4 Valutazione delle intensità di picco per i risultati fuori scala (QC picchi fuori scala)

Gli strumenti per l'elettroforesi capillare hanno un intervallo limitato per la rilevazione dei segnali fluorescenti dai frammenti di DNA con etichetta colorata. In alcune situazioni, il segnale fluorescente proveniente dai prodotti di amplificazione OncoMate™ MSI Dx Analysis System possono superare il limite superiore dello strumento di rilevamento. Quando ciò si verifica, lo strumento restituisce un flag di QC picchi fuori scala che verrà visualizzato nel software di analisi dei frammenti. Le intensità di picco fuori scala possono dare origine a bleedthrough di segnale in altri canali di colorante (Figura 10; Sezione 6.3.5). Dal momento che i modelli di picco bleedthrough sono simili al modello del segnale originale, questo bleedthrough può essere confuso con un allele in un campione normale o tumorale, complicando l'interpretazione dell'instabilità dei microsatelliti. Un campione paziente o un campione di controllo deve essere considerato non valido quando si osservano risultati fuori scala. I risultati fuori scala osservati per i controlli di amplificazione positivi 2800M indicano un problema sistemico nella preparazione o nell'amplificazione delle reazioni OncoMate™ MSI Dx Analysis System e potenziali problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni testati. Nei lotti in cui un controllo positivo non supera il QC dei picchi fuori scala, tutti i campioni del lotto devono essere interpretati come non validi e indirizzati secondo le indicazioni fornite nella Sezione 9. Valutare i dati per i risultati fuori scala in ogni campione analizzato e nel controllo di amplificazione 2800M.

6.3.5 Valutazione del pull-up spettrale in tutti i marker (QC pull-up spettrale)

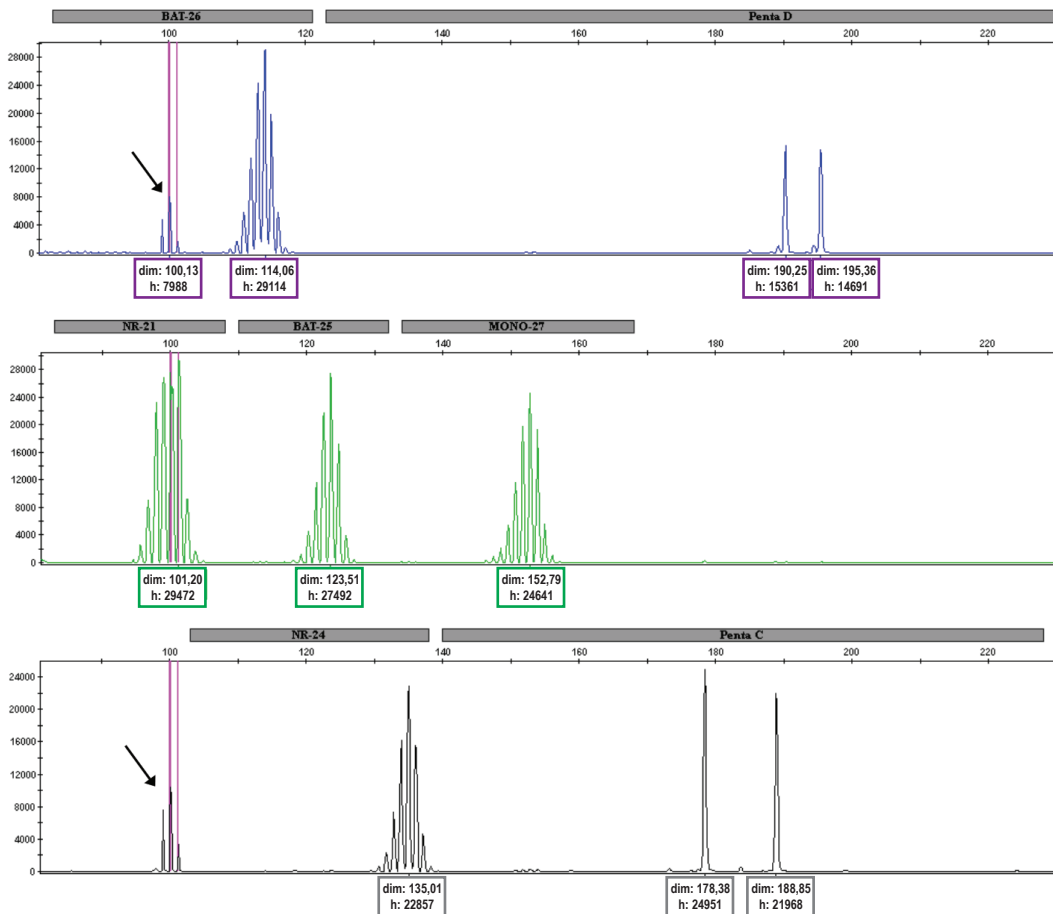
Quando si osservano risultati fuori scala o quando la calibrazione spettrale dello strumento per l'elettroforesi capillare è inadeguata (ad esempio, a causa delle regolazioni all'ottica dello strumento durante una chiamata di servizio), è possibile che vengano rilevati segnali fluorescenti dai frammenti con etichetta colorata all'esterno del canale di colore inteso all'incirca alla stessa dimensione (bp) del segnale reale. Questa situazione viene definita pull-up spettrale o bleedthrough. Quando viene rilevato il bleedthrough in altri canali di colorante, è possibile che venga visualizzato un flag QC dal software di analisi dei frammenti.

Per impostare i parametri per rilevare il pull-up spettrale, fare riferimento al manuale tecnico per il software di analisi dei frammenti selezionato. Nell'Appendice C vengono forniti i parametri corrispondenti a quelli utilizzati durante la valutazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Dal momento che i modelli di picco sono simili al modello del segnale originale, questo bleedthrough può essere confuso con un allele in un campione normale o tumorale, complicando l'interpretazione dell'instabilità dei microsatelliti. La presenza di segnali bleedthrough nei controlli di amplificazione positivi 2800M indicherebbe potenziali problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni nel test. Per questi motivi, i campioni dei pazienti affetti o di controllo devono essere considerati non validi se viene osservato un bleedthrough superiore alla soglia analitica. Valutare i dati per il bleedthrough in ogni campione paziente analizzato e nel controllo di amplificazione positivo. Per valutare i campioni per i picchi bleedthrough, visualizzare tutti i canali colorante mostrati sullo stesso grafico (Figura 10). Cercare i picchi della stessa dimensione presenti in due o più canali di colorante. I picchi originali in un canale di colorante avranno un'intensità notevolmente superiore rispetto ai picchi bleedthrough negli altri canali di colorante. Per i frammenti di OncoMate™ MSI Dx Analysis System, è possibile osservare il bleedthrough nei seguenti modelli:

- a. Nei pannelli NR-21 o BAT-25 è possibile osservare picchi BAT-26
- b. Nei pannelli BAT-25 o MONO-27 è possibile osservare picchi Penta D
- c. Nei pannelli BAT-26 o NR-24 è possibile osservare picchi NR-21
- d. Nei pannelli BAT-26, Penta D o NR-24 è possibile osservare picchi BAT-25
- e. Nei pannelli Penta D, NR-24 o Penta C è possibile osservare picchi MONO-27
- f. Nei pannelli NR-21, BAT-25 o MONO-27 è possibile osservare picchi NR-24
- g. Nel pannello MONO-27 è possibile osservare picchi Penta C

In alcune situazioni, picchi di frammenti originali possono essere allineati tra i canali di colorante e confusi con il bleedthrough. In tali occasioni, ripetere la calibrazione spettrale dello strumento per l'elettroforesi capillare e ripetere il test per offrire fiducia nei dati e nell'interpretazione dell'instabilità dei microsatelliti che ne deriva.



16186TA

Figura 10. Campioni di tessuto normale fuori scala, con bleedthrough del segnale prominente tra canali di colorante. I picchi in NR-21 hanno superato il limite di rilevamento dello strumento per elettroforesi capillare, dando luogo a un flag di fuori scala e a un piccolo bleedthrough di un modello simile in altri marker. **Pannello A.** Marker nel canale di colorante blu, che evidenzia un cluster di picchi bleedthrough di segnale da NR-21 a BAT-26. **Pannello B.** Marker nel canale di colorante verde, che evidenzia picchi di frammenti fuori scala per NR-21. **Pannello C.** Marker nel canale di colorante giallo/nero; i picchi bleedthrough da NR-21 a questo canale di colorante sono esterni ai pannelli dei marker.

6.3.6 Valutazione di tutti i marker per i picchi ampi (QC picchi ampi)

È possibile osservare picchi di frammenti ampi, denominati alleli nei dati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Tali picchi mostrano un modello di salita e discesa leggera, distribuite su diverse coppie di base e si distinguono facilmente dai picchi di frammenti originali, la cui salita e discesa sono nette in un intervallo da 1 bp a 2 bp. È possibile osservare sporadicamente dei picchi ampi come conseguenza dell'amplificazione PCR anomala o dell'analisi dell'elettroforesi capillare. Spesso si osserva un artefatto di amplificazione tra 83 bp e 90 nel marker NR-21 dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System (per ulteriori dettagli, vedere la Sezione 6.2). Quando vengono osservati dei picchi ampi, è possibile che il software di analisi dei frammenti visualizzi un flag QC.

Per impostare i parametri per rilevare i picchi ampi, fare riferimento al manuale tecnico del software di analisi dei frammenti selezionato. Nell'Appendice C (Sezione 11.3) vengono forniti i parametri corrispondenti a quelli utilizzati durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Ispezionare i campioni paziente e di controllo in corrispondenza di ciascun marker per i picchi ampi denominati alleli. Un picco ampio in NR-21 tra 83 bp e 90 bp non è correlato all'instabilità dei microsatelliti e il fatto che venga rilevato non è indice di errore del QC dei picchi ampi. Quando si rileva un picco ampio per uno o più marker, la qualità dei dati si riduce. L'interpretazione dei dati può comunque essere possibile per i marker non interessati in base alle indicazioni fornite nella Sezione 6.5. I picchi ampi nei campioni di controllo possono indicare potenziali problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni. Nei lotti in cui un campione di controllo non supera il QC dei picchi ampi del campione, tutti i campioni del lotto devono essere interpretati come non validi e indirizzati secondo le indicazioni fornite nella Sezione 9.

6.3.7 Valutazione di tutti i marker per l'amplificazione degli alleli (QC amplificazione degli alleli)

Ispezionare i campioni paziente e i controlli positivi 2800M in ciascun marker per valutare se è presente un picco di frammento originale al di sopra della soglia analitica (vedere le Sezioni 3.9 e 7.5). Quando non si rilevano alleli per uno o più marker, la qualità dei dati del campione si riduce. Documentare i marker per i quali il QC di amplificazione degli alleli ha esito negativo. L'interpretazione dei dati può comunque essere possibile per i marker non interessati in base alle indicazioni fornite nella Sezione 6.3. **Nota:** per consentire l'interpretazione di un determinato marker di ripetizione del mononucleotide, è necessario rilevare almeno un allele. L'assenza di alleli nel controllo di amplificazione positivo 2800M indica potenziali problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni. Nei lotti in cui un campione di controllo positivo non supera il QC di amplificazione degli alleli, tutti i campioni del lotto devono essere interpretati come non validi e indirizzati secondo le indicazioni fornite nella Sezione 9.

6.3.8 Valutazione del controllo di amplificazione positivo e dei campioni paziente normali per la contaminazione del DNA (QC contaminazione DNA)

L'analisi del numero di alleli rilevati nei marker di ripetizione del pentanucleotide talvolta può fornire informazioni sulla contaminazione dei campioni da fonti esterne di DNA umano. Contare il numero di alleli identificati per ciascun marker di ripetizione del pentanucleotide nei campioni di controllo dell'amplificazione positivi e nei campioni paziente normali. Il QC di contaminazione del DNA ha esito negativo quando vengono rilevati tre o più alleli per Penta C o Penta D. L'instabilità genomica associata a determinati tumori può dar luogo alla presenza di oltre due alleli nel campione tumorale. Pertanto, la valutazione dei campioni tumorali dei pazienti mediante QC di contaminazione del DNA non fornisce informazioni. L'errore osservato per il campione di controllo dell'amplificazione positivo 2800M indica potenziali problemi di qualità dei dati per l'intero lotto di campioni. Nei lotti in cui un campione di controllo positivo non supera il QC di contaminazione del DNA, tutti i campioni del lotto devono essere interpretati come non validi e indirizzati secondo le indicazioni fornite nella Sezione 9. I campioni normali dei pazienti che non superano il QC di contaminazione del DNA devono essere considerati non validi e indirizzati secondo le indicazioni fornite nella Sezione 9.

6.3.9 Valutazione dei marker di ripetizione del pentanucleotide nei campioni paziente per l'identità (QC identità dei campioni paziente)

Confrontare gli alleli in ciascun marker di ripetizione del pentanucleotide per garantire che i campioni normali e tumorali provengono dallo stesso paziente. Il QC dell'identità dei campioni paziente viene superato quando tutti gli alleli identificati nel campione normale sono presenti anche nel campione tumorale. L'instabilità genomica associata a determinati tumori può dar luogo alla presenza di un numero maggiore o minore di alleli nel campione tumorale relativo al campione normale. La presenza di altri alleli nel campione tumorale è stata osservata e non genera problemi di QC dell'identità dei campioni paziente. Alleli aggiuntivi nel campione tumorale in corrispondenza dei marker Penta non indica instabilità dei microsatelliti. D'altra parte, un allele mancante nel campione tumorale può indicare uno scambio di campioni o la perdita di eterozigosità (LOH) nel marker (vedere la Sezione 6.5.3). Le coppie di campioni che non superano il QC dell'identità dei campioni paziente a causa di un allele mancante nel campione tumorale possono comunque essere interpretabili in base alle linee guida fornite nella Sezione 6.5.3. Le coppie di campioni che non superano il QC dell'identità dei campioni paziente per altre ragioni devono essere considerate non valide e indirizzate in base alle indicazioni fornite nella Sezione 9. I controlli positivi e negativi non vengono valutati per il QC dell'identità dei campioni paziente.

6.3.10 Valutazione dei marker di ripetizione del mononucleotide nei campioni tumorali per il segnale (QC segnale tumorale)

Per ciascun marker di ripetizione del mononucleotide, quando nel campione tumorale non vengono identificati nuovi alleli rispetto al campione normale, il marker viene interpretato come stabile. Tuttavia, l'allele normale ("di riferimento") nel campione tumorale deve essere presente a un'intensità sufficiente, sulla base del contenuto tumorale del campione, a garantire il rilevamento di nuovi alleli al di sopra della soglia analitica. Pertanto, è necessario ispezionare l'intensità di picco in ciascun marker di ripetizione del mononucleotide apparentemente stabile per stabilire se l'intensità dell'allele è sufficiente a garantire la sensibilità del test per rilevare nuovi alleli.

Per la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, abbiamo determinato una soglia analitica di 175 RFU con un contenuto tumorale minimo del 20%, corrispondente a una frazione tumorale di 0,2. Per garantire la sensibilità del test, abbiamo utilizzato la seguente formula per calcolare un'intensità di picco normale-allele minima richiesta di 700 RFU nei marker di ripetizione del mononucleotide apparentemente stabili nei campioni tumorali:

$$\text{Intensità del segnale tumorale (RFU)} \geq \text{Soglia analitica} \times \frac{1}{\text{Frazione tumorale minima}} \times (1 - \text{Frazione tumorale minima})$$

A un'intensità di picco minima di 700 RFU, un nuovo allele presente al 20% (frazione tumorale di 0,2) del campione totale avrà un'altezza di picco prevista di 175 RFU (vale a dire, 175 RFU è il 20% del segnale totale di 875 RFU, dove 700 RFU è l'80% del segnale totale di 875 RFU). Ciò consente di garantire che l'intensità del segnale sia sufficiente a essere certi di una chiamata stabile per un determinato marker nei campioni con $\geq 20\%$ di contenuto tumorale. Documentare i marker che non superano il QC del segnale tumorale. L'interpretazione dei dati può comunque essere possibile per i marker non interessati in base alle indicazioni fornite nella Sezione 6.5. I controlli positivi e negativi non vengono valutati per il QC del segnale tumorale.

6.4 Determinazione della stabilità del marker di ripetizione del mononucleotide

L'analisi dei marker di ripetizione del mononucleotide nelle coppie di campioni normale e tumorale determina la stabilità del marker, che informa sullo stato di instabilità dei microsatelliti tumorali. La stabilità viene valutata per singolo marker e l'instabilità viene identificata mediante la presenza di uno o più alleli di microsatelliti nel campione tumorale rispetto al campione normale dello stesso paziente. In alcuni tumori, possono essere presenti sottili alterazioni degli alleli ed è possibile che nuovi alleli distinti non siano identificati mediante il software di analisi dei frammenti esistente; per questi campioni, il confronto visivo degli elettroferogrammi per rilevare le differenze può identificare l'instabilità. In altri tumori, come quelli dei pazienti CRC MSI-High, le alterazioni dei profili dei microsatelliti sono pronunciate e sono presenti nuovi alleli distinti con picchi stutter affiancati di intensità decrescente. Ripetere l'analisi di un campione con contenuto tumorale aumentato e/o con tempi di iniezione dell'elettroforesi capillare diversi può fornire informazioni quando la stabilità del marker è equivoca o indeterminata (Guedes, 2017; Wang, 2017; Boyle, 2014). Il processo per determinare la stabilità del marker è riepilogato nella Figura 11. La Tabella 6 riepiloga i risultati possibili quando si determina la stabilità dei marker di ripetizione del mononucleotide. Non è possibile determinare la stabilità del marker per i campioni paziente identificati come non validi, a causa di un errore critico di QC dei dati (Sezione 6.3).

Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, abbiamo impiegato un algoritmo semplice per determinare la stabilità dei dati: Per ognuno dei cinque marker di ripetizione del mononucleotide nel campione normale e tumorale del paziente, l'allele più piccolo identificato è stato considerato l'allele di interesse per i confronti successivi. La differenza di dimensioni tra gli alleli di interesse nei campioni normale e tumorale è stata calcolata per determinare la stabilità del marker. Nei casi in cui la differenza era ≥ 3 bp (implementati nella pratica come $\geq 2,75$ bp per tenere conto della precisione di dimensionamento dello strumento per l'elettroforesi capillare), il marker è stato interpretato come instabile.

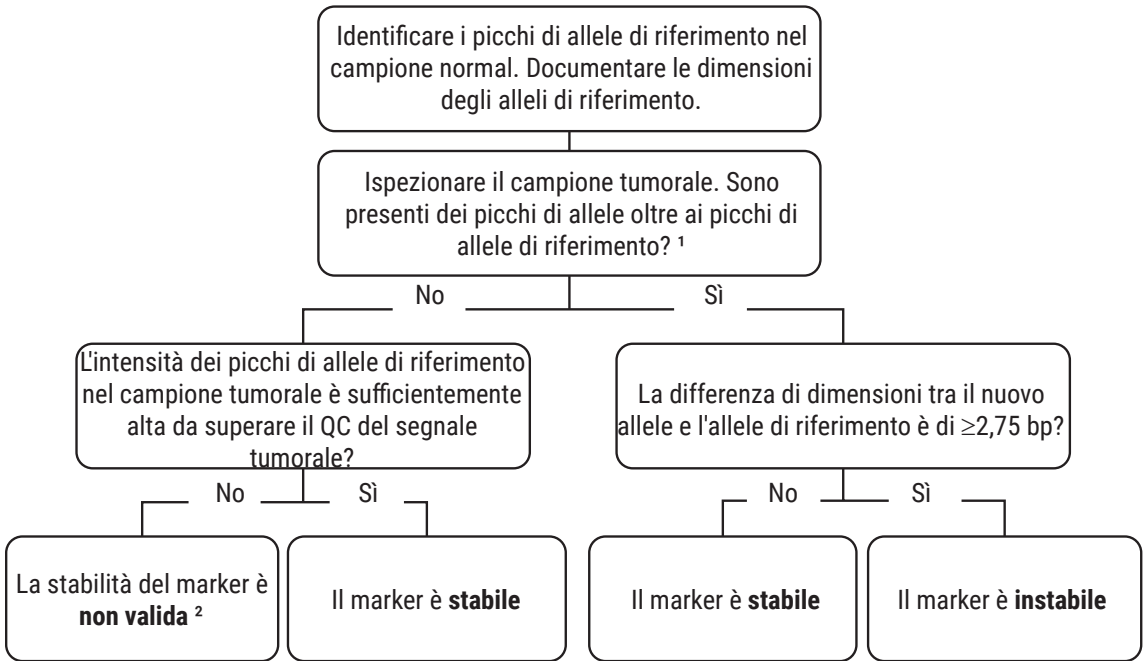
Tabella 6. Chiamate di stabilità del marker di ripetizione del mononucleotide ricavato confrontando gli alleli presenti nei campioni normale e tumorale.

Chiamata di stabilità del marker

La chiamata di stabilità assegnata a ciascun marker per il campione

Valore	Descrizione
Stabile	L'instabilità dei microsatelliti non è stata rilevata per il marker di ripetizione del mononucleotide. Nel campione tumorale non sono stati rilevati nuovi alleli o la differenza di dimensioni tra un nuovo allele tumorale e l'allele di riferimento normale era insignificante ($< 2,75$ bp).
Instabile	L'instabilità dei microsatelliti è stata rilevata per il marker di ripetizione del mononucleotide. Nel campione tumorale è stato rilevato un nuovo allele o la differenza di dimensioni tra questo allele e l'allele di riferimento normale era significativa ($\geq 2,75$ bp).
Non valido	Non è stato possibile valutare l'instabilità dei microsatelliti per il marker di ripetizione del mononucleotide. La qualità dei dati del campione non era accettabile a causa di un errore critico del QC (vedere la Sezione 6.3).

Per ciascun marker di ripetizione del mononucleotide che supera il QC:



1. I campioni tumorali spesso comprendono una combinazione di cellule normali e cellule tumorali; la presenza dell'allele di riferimento normale nel campione tumorale è comune.
2. Per maggiori informazioni, vedere la Sezione 9 Risoluzione dei problemi.

Figura 11. Indicazioni generali per la valutazione della stabilità del marker di ripetizione del mononucleotide per i campioni paziente. Seguire il diagramma di flusso per ciascun marker di ripetizione del mononucleotide che soddisfa i requisiti di QC dei dati specificati nella Sezione 6.3. Documentare la stabilità di ciascun marker, quindi passare alla Sezione 6.5, Interpretazione dello stato dell'instabilità dei microsatelliti del tumore. **Nota:** per interpretare un determinato marker di ripetizione del mononucleotide, è necessario superare tutti i controlli QC per quel marker sia nei campioni normali che nei campioni tumorali.

6.5 Interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti del tumore

6.5.1 Riepilogo

Il processo di interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti sulla base delle chiamate di stabilità determinate per i marker dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è riepilogato nella Figura 12. La Tabella 7 riepiloga i punti finali per l'interpretazione dello stato di instabilità dei microsatelliti per il campione tumorale. Questo metodo segue le regole del consenso per determinare lo stato di instabilità dei microsatelliti dei campioni definito nel corso dell'US National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability (Boland, 1998). Se non vengono osservati errori di QC critici, lo stato di instabilità dei microsatelliti dei campioni viene interpretato come indicato di seguito:

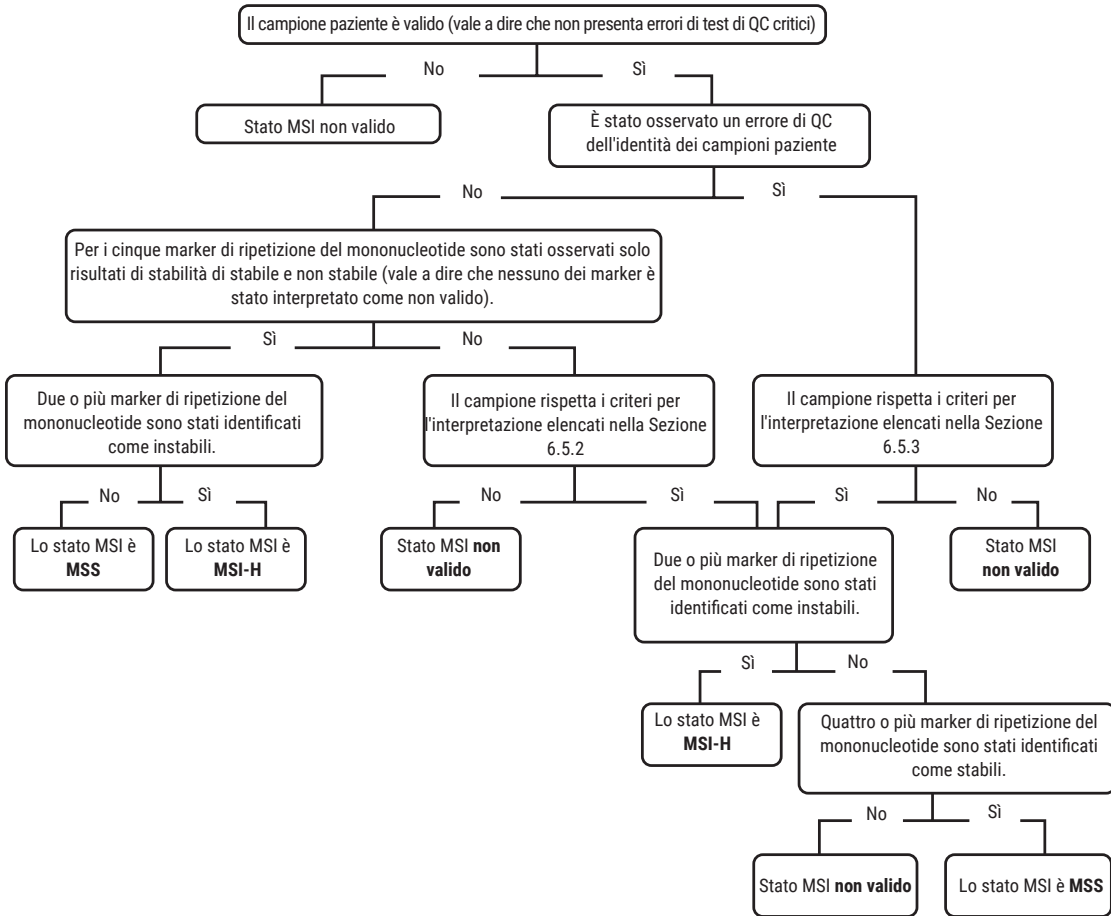
Un campione tumorale viene interpretato come MSI-H quando due o più marker di ripetizione del mononucleotide sono interpretati come instabili. Un campione tumorale viene interpretato come MSS quando meno di due marker di ripetizione del mononucleotide sono interpretati come instabili (Boland, 1998; Hampel, 2008; Umar, 2004).

È comunque possibile determinare l'instabilità dei microsatelliti quando si ottengono risultati non validi per un sottoinsieme di marker (vedere la Sezione 6.5.2) o quando si osserva un errore di QC dell'identità dei campioni paziente (vedere la Sezione 6.5.3). Di seguito vengono fornire le indicazioni per interpretare tali campioni. I campioni con meno di due marker di ripetizione del mononucleotide non possono essere interpretati e devono essere indirizzati in base alle indicazioni fornite nella Sezione 9.

Tabella 7. Stato dell'instabilità dei microsatelliti del tumore ricavato dalla somma dei risultati della stabilità dei marker.

Valore	Descrizione
MSS	MSS (microsatellite stabile) indica che meno di due marker di ripetizione del mononucleotide sono stati identificati come instabili.
MSI-H	(MSI alta) indica che due o più marker di ripetizione del mononucleotide sono stati identificati come instabili.
Non valido	"Non valido" indica che la qualità dei dati del campione non è accettabile a causa di un errore critico del QC dei dati (vedere la Tabella 5). Da questi dati non è possibile eseguire alcuna interpretazione MSI. Quando un lotto non supera il QC dei dati per un problema con il controllo di amplificazione positivo o negativo, tutti i campioni all'interno dello stesso lotto devono essere interpretati come non validi. Per indicazioni sulla risoluzione dei problemi relativi al QC che generano risultati non validi, vedere la sezione del presente manuale dedicata alla risoluzione dei problemi.

Interpretazione dello stato MSI di ciascun campione paziente:



T6188MA

Figura 12. Indicazioni generali per determinare lo stato MSI di un campione tumorale. Seguire il diagramma di flusso per ciascun campione che supera il QC dei dati.

6.5.2 Interpretazione dell'MSI nei casi in cui un sottoinsieme di marker presenti risultati di stabilità non validi

Quando le intensità dei picchi di allele per i marker di ripetizione del mononucleotide sono troppo basse per la valutazione dei dati, i campioni presenteranno errori di QC del segnale tumorale o errori di QC di amplificazione degli alleli e uno stato di stabilità dei marker non valido. Quando un picco ampio interferisce con il dimensionamento dei picchi di alleli, un campione presenterà un errore di QC dei picchi ampi e uno stato di stabilità del marker non valido.

L'interpretazione dell'MSI è possibile per un campione paziente che mostra risultati di stabilità non validi in un sottoinsieme di marker di ripetizione del mononucleotide se le seguenti condizioni sono vere:

1. Non è stato possibile rettificare altezze dei picchi di marker ridotte a) aumentando l'input di DNA per la reazione di amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System o b) rianalizzando una sezione diversa di tessuto FFPE.
2. Non si osservano errori di QC per nessuno dei marker di ripetizione del pentanucleotide.
3. Gli unici errori di QC dei dati sono il QC del segnale tumorale, il QC di amplificazione degli alleli e/o il QC dei picchi ampi.
4. È stato possibile eseguire una chiamata stabile o instabile per due o più marker di ripetizione del mononucleotide.

Se si soddisfano queste condizioni, il campione può essere interpretato con i restanti dati di stabilità validi utilizzando le seguenti linee guida (Boland, 1998):

1. Se due o più marker di ripetizione del mononucleotide sono instabili, interpretare il campione tumorale come MSI-H.
2. Se quattro o più marker di ripetizione del mononucleotide sono stabili, interpretare il campione tumorale come MSS.
3. In caso contrario, non è possibile interpretare il campione. Lo stato MSI del campione sarà non valido.

6.5.3 Interpretazione dell'MSI quando si osserva un errore di QC dell'identità del campione paziente

All'interno dei campioni tumorali i marker pentanucleotide possono perdere o visualizzare altri alleli che complicano l'interpretazione dell'identità con i campioni normali. Gli eventi di genetica comuni osservati con il tessuto tumorale includono la perdita di eterozigotità e l'instabilità genomica generalizzata, che possono interferire con l'autenticazione del campione (vale a dire, la conferma dell'identità tra campioni normali e tumorali accoppiati). I marker di ripetizione del pentanucleotide possono mostrare un numero di alleli diverso in un campione tumorale rispetto al campione normale accoppiato. La presenza di altri alleli in un campione tumorale non genera un errore di QC dei dati.

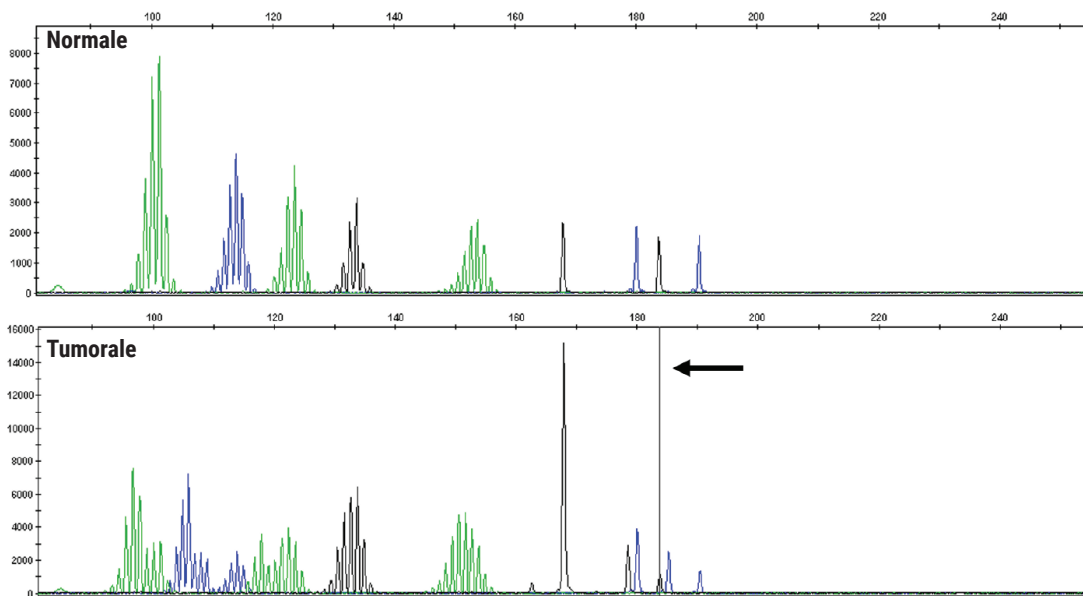
D'altra parte, i casi di squilibrio pronunciato degli alleli (ad esempio, la perdita di eterozigotità) possono generare la presenza di un allele di pentanucleotide in un campione normale che non viene chiamato allele in un campione tumorale. Viene osservato uno squilibrio grave degli alleli quando uno degli alleli del pentanucleotide normale viene perso (vale a dire che la sua altezza di picco si riduce notevolmente e non viene identificato come allele) nel tumore. Tale stato può portare a un errore apparente di QC dell'identità dei campioni paziente. Per verificare se è presente un allele normale "perduto" sopra la soglia analitica ed è stato semplicemente filtrato mediante l'algoritmo software di denominazione degli alleli, aprire il file del campione nel software di analisi dei frammenti e portare il cursore sul picco "perduto" nell'elettroferogramma per il campione tumorale. Quando si passa il cursore su un potenziale picco "perduto" nel software GeneMapper[®], si vedrà apparire una riga nera verticale per indicare che il picco era al di sopra della soglia analitica ma che è stato filtrato e pertanto non è stato identificato come allele (Figura 13). In alternativa, è possibile ingrandire un potenziale picco "perduto" per accertarsi che tale picco sia al di sopra della soglia analitica. Se il software di analisi dei frammenti selezionato non supporta questa funzione, verificare che l'altezza del picco dell'allele perduto sia al di sopra della soglia analitica.

L'interpretazione dell'MSI è possibile per un campione paziente che mostra un apparente errore di QC dell'identità dei campioni paziente se le seguenti condizioni sono vere:

1. L'errore di QC è stato osservato per un singolo marker di ripetizione del pentanucleotide (ad esempio, Penta C o Penta D, non entrambi).
2. L'allele normale "perduto" è presente nel campione tumorale al di sopra della soglia analitica, ma è stato filtrato come stutter dall'algoritmo di denominazione degli alleli del software di analisi dei frammenti a causa dell'altezza notevolmente superiore di un altro allele nello stesso pannello.
3. Per i marker di ripetizione del mononucleotide non si osservano errori di QC.

Se queste condizioni sono soddisfatte, è possibile interpretare i dati utilizzando le seguenti linee guida:

1. Se due o più marker di ripetizione del mononucleotide sono instabili, interpretare il campione tumorale come MSI-H.
2. Se quattro o più marker di ripetizione del mononucleotide sono stabili, interpretare il campione tumorale come MSS.



16189TA

Figura 13. Un esempio di squilibrio pronunciato degli alleli. Nei casi di squilibrio pronunciato degli alleli nei marker di ripetizione pentanucleotide, quando si passa il cursore su un picco tumorale "perduto" nell'elettroferogramma del campione tumorale, viene visualizzata una linea verticale nera se questo picco è presente ed è al di sopra della soglia analitica ma è stato filtrato come stutter a causa dell'altezza di picco notevolmente superiore dell'allele 168 bp nello stesso pannello.

7. Controllo della qualità del test

7.1 Calibrazione spettrale

Durante l'elettroforesi capillare, i prodotti dell'amplificazione dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System con etichetta colorata vengono separati per dimensione e rilevati. Prima dell'analisi, lo strumento per l'elettroforesi capillare selezionato viene calibrato con gli standard di matrice per distinguere i colori specifici utilizzati nel test. OncoMate™ 5C Matrix Standard (N. cat. Promega MD3580) è composto da frammenti di DNA etichettati con cinque colori fluorescenti diversi (fluoresceina, JOE, TMR-ET, CXR-ET e WEN) in una sola provetta. Eseguire una calibrazione spettrale in base ai parametri generali forniti nell'Appendice A (Sezione 11.1). Una volta generato, il file di calibrazione spettrale viene applicato automaticamente durante il rilevamento dei campioni per tenere conto della sovrapposizione dello spettro tra i colori e per separare i segnali fluorescenti non elaborati in singoli segnali colorati.

7.2 Campione di tessuto normale accoppiato

I marker di ripetizione del mononucleotide possono mostrare eterozigosità o variazione della lunghezza degli alleli nel tessuto normale tra un individuo e l'altro (Bacher, 2004). Per spiegare tali variazioni negli alleli normali, è necessario elaborare un campione di tessuto normale accoppiato parallelamente a ogni campione tumorale. Inoltre, il riesame del campione di tessuto normale può essere importante nella valutazione del campione tumorale relativamente alle alterazioni sottili nella lunghezza degli alleli. Generalmente, i campioni tumorali comprendono una combinazione di cellule normali e tumorali. Gli alleli tumorali nuovi possono sovrapporsi ai picchi stutter del componente delle cellule normali all'interno del campione tumorale, e il confronto diretto con il tessuto normale può essere necessario per interpretare i dati. Se per una qualsiasi ragione è necessario ripetere l'analisi di un campione tumorale o normale, è necessario eseguire nuovamente anche il campione tumorale o normale accoppiato, per spiegare le possibili variazioni tra un ciclo e l'altro.

7.3 Controlli positivi e negativi

Le reazioni di amplificazione del controllo positivo e negativo (assenza di modello) che utilizzano rispettivamente 2800M Control DNA e acqua con grado di amplificazione, devono essere analizzati contemporaneamente ai campioni paziente per verificare le prestazioni del test. In ogni piastra di campioni paziente è necessario includere almeno una reazione di amplificazione 2800M Control DNA e una reazione di amplificazione di controllo negativo. La reazione di controllo negativo viene analizzata per garantire che nelle reazioni senza modello non si siano verificate amplificazioni impreviste. Un'amplificazione imprevista in una reazione di controllo negativo indica una contaminazione del DNA che causa un risultato del test non valido. I controlli negativi non devono avere picchi amplificati al di sopra della soglia analitica. La reazione di controllo positiva viene analizzata per dimostrare che il comportamento della chimica dell'amplificazione è stato quello previsto. Risultati imprevisti in un controllo positivo possono indicare un'amplificazione non ottimale o non riuscita. Per i risultati previsti per il 2800M Control DNA, vedere la Tabella 8.

Tabella 8. Risultati previsti utilizzando 1 ng di 2800M Control DNA.

Nome marker	Alleli 2800M (bp)^{1,2}
NR-21	101
BAT-26	115
BAT-25	124,5
NR-24	134
MONO-27	152,5
Penta C	178,5; 184
Penta D	195,5; 200,5

¹Le dimensioni degli alleli sono state determinate utilizzando Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con il POP-7® Polymer e una matrice capillare di 50 cm. Le dimensioni determinate su altri strumenti o con configurazioni diverse dei materiali di consumo possono variare leggermente.

²La variabilità da strumento a strumento o da giornata a giornata nelle prestazioni dello strumento per l'elettroforesi capillare può generare una differenza all'incirca di ± 1 bp nelle dimensioni attese degli alleli per 2800M Control DNA.

7.4 Standard dell'elettroforesi capillare

Tutti i campioni e i controlli analizzati devono contenere Size Standard 500. Size Standard 500 contiene una serie di 21 frammenti di DNA di lunghezza nota (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500 bp). Ciascun frammento è etichettato con il colore WEN e viene rilevato separatamente (come quarto colore, arancione) in presenza di prodotti amplificati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System durante l'elettroforesi capillare. Size Standard 500 viene utilizzato per assegnare le dimensioni ai prodotti amplificati per ciascun campione e controllo utilizzando il metodo Local Southern (Southern, 1979). Lo standard delle dimensioni controlla le variazioni da capillare a capillare nella precisione del dimensionamento durante l'elettroforesi capillare e consente il confronto diretto dei campioni nel ciclo di elettroforesi capillare. Solo i frammenti tra 60 bp e 300 bp vengono analizzati utilizzando il software di analisi dei frammenti selezionato.

7.5 Soglia analitica

Durante l'analisi mediante il software di analisi dei frammenti, è necessario stabilire e applicare una soglia analitica per garantire la certezza nell'interpretazione dei dati dell'instabilità dei microsatelliti. Sono disponibili diversi metodi di definizione di una soglia analitica corretta, che è possibile reperire nella letteratura pubblicata (ad esempio, Bregu, 2013). Durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, abbiamo determinato la soglia analitica di 175 RFU utilizzando l'approccio del limite superiore, basato sulla regressione lineare delle intensità di picco, generate dai campioni contenenti ingressi di DNA differenti (Bregu, 2013).

8. Limitazioni specifiche

Il contenuto tumorale dei campioni tumorali può influire sulla capacità del software di dimensionamento del frammento di identificare un allele. Il contenuto tumorale deve essere $\geq 20\%$ e l'abbondanza di cellule nucleate deve essere sufficiente sulla base della caratterizzazione patologica standard. I campioni tumorali che non soddisfano questi criteri non sono indicati per l'uso con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

L'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stato valutato utilizzando DNA di input purificato dai campioni di tessuto FFPE del colon mediante Maxwell® CSC Instrument e Maxwell® CSC FFPE DNA Kit e successivamente mediante l'analisi dei prodotti dell'amplificazione con l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con GeneMapper® Software versione 5.0. Prima di utilizzare altri metodi di estrazione del DNA, strumenti per l'elettroforesi capillare, software di analisi dei frammenti o metodi di analisi, l'utente deve stabilire che tali metodi siano indicati per l'uso con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Il software di dimensionamento dei frammenti dispone di diverse capacità di identificazione di un allele tumorale alterato per identificare o un modello di marker del microsatellite. Per un'interpretazione accurata, confrontare il campione tumorale con un campione di tessuto normale proveniente dallo stesso paziente.

I loci dei microsatelliti inclusi nel sistema sono quasimonomorfici. In rari casi sono stati osservati modelli di alleli eterozigoti. Per un'interpretazione accurata, confrontare il campione tumorale con un campione di tessuto normale dello stesso paziente.

La manutenzione degli strumenti e dei relativi accessori utilizzati con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System deve essere eseguita secondo le raccomandazioni del produttore e deve soddisfare i criteri definiti per l'uso con questo prodotto.

9. Risoluzione dei problemi

Per le domande per le quali non viene fornita risposta in questa sede, consultare la guida per l'utente per lo strumento o l'accessorio applicabile oppure contattare la filiale o il distributore Promega. Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: **www.promega.com** o tramite e-mail: **genetic@promega.com**

Problema	Cause e commenti
I frammenti di Size Standard 500 mostrano una risoluzione bassa, un numero di frammenti ridotto rispetto a quello previsto o intensità di picco ridotte, con conseguente errore di QC del Sizing Quality (anche gli ampliconi possono essere interessati)	Nella fluidica degli strumenti sono presenti delle bolle. Seguire la procedura del produttore dello strumento per eliminare le bolle nella fluidica dello strumento, quindi ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati, inclusi i controlli positivi e negativi.
	Nel polimero sono presenti contaminanti o depositi di cristallo. Nel ricostituire il polimero, accertarsi di portarlo a temperatura ambiente come indicato dal produttore. Ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati, inclusi i controlli positivi e negativi.
	Uno o più capillari sono bloccati. Ricaricare la matrice capillare, quindi ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati, inclusi i controlli positivi e negativi. Potrebbe essere necessario installare una nuova matrice capillare.
	Size Standard 500 non è stato aggiunto al cocktail di caricamento dell'elettroforesi capillare. Preparare il cocktail di caricamento per l'elettroforesi capillare fresco includendo il Size Standard 500 e ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per tutti i campioni e i controlli.
	Le punte di irrigazione non sono a contatto con il cocktail di caricamento. Accertarsi che a ciascun pozzetto richiesto della piastra a 96 pozzetti siano stati aggiunti 11 µl di miscela di campione di cocktail di caricamento e che la piastra sia stata centrifugata brevemente prima di avviare il ciclo di elettroforesi capillare. Ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati, inclusi i controlli positivi e negativi. Rivedere l'elettroferogramma per risolvere la causa principale del flag di QC relativo a Sizing Quality.
Impossibile avviare il ciclo di elettroforesi capillare quando richiesto	Nella fluidica degli strumenti per l'elettroforesi capillare sono presenti delle bolle. Rimuovere le bolle seguendo le istruzioni del produttore. Riavviare il ciclo di elettroforesi capillare.

Problema

Cause e commenti

Impossibile avviare il ciclo di elettroforesi capillare quando richiesto (continua)

Si è verificato un errore sul computer di sistema. Riavviare lo strumento per l'elettroforesi capillare e il computer dello strumento seguendo le istruzioni del produttore, quindi riavviare il ciclo di elettroforesi capillare.

Uno o più materiali di consumo dello strumento sono scaduti o hanno raggiunto il limite del campione. Sostituire lo strumento scaduto o i materiali di consumo esauriti, quindi riavviare il ciclo di elettroforesi capillare.

Nel canale di colore Size Standard 500 vengono rilevati picchi imprevisti che causano un problema di QC relativo al Sizing Quality

Artefatti correlati all'elettroforesi capillare. Durante l'elettroforesi capillare possono essere osservati dei picchi aberranti. Quando tali picchi interessano il canale di colore arancione, i picchi di Size Standard 500 possono essere oscurati o è possibile che le dimensioni vengano assegnate in modo errato dal software di analisi dei frammenti. Ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati, inclusi i controlli positivi e negativi. Se il problema persiste, sostituire i materiali di consumo dell'elettroforesi capillare. Rivedere l'elettroferogramma per risolvere la causa principale del flag di QC relativo a Sizing Quality.

Per la reazione di amplificazione di 2800M Control DNA viene osservata una scarsa amplificazione o uno squilibrio tra marker nelle intensità degli alleli (anche i campioni potrebbero essere interessati)

La soluzione 2800M Control DNA madre o la diluizione di 2800M Control DNA non è stata agitata sufficientemente. È possibile osservare intensità di picco ridotte o eccessive, inclusa l'eccessiva amplificazione degli alleli Penta D. Ripetere le reazioni di amplificazione e l'analisi con elettroforesi capillare, inclusi i controlli positivi e negativi.

La miscela di amplificazione PCR non è stata agitata sufficientemente. Ripetere le reazioni di amplificazione e l'analisi con elettroforesi capillare, inclusi i controlli positivi e negativi.

La diluizione di 2800M Control DNA era stata preparata in precedenza e riutilizzata. Preparare una diluizione fresca di 2800M Control DNA, quindi ripetere le reazioni di amplificazione e l'analisi con elettroforesi capillare, includendo un campione di controllo positivo preparato fresco e un controllo negativo.

Problema

Altezze di picco ridotte per i campioni normali o tumorali. I campioni tumorali possono presentare un errore di QC del segnale tumorale.

Cause e commenti

DNA modello insufficiente. Altezze di picco ridotte possono interferire con l'interpretazione dei dati. Le intensità di picco degli alleli nei campioni tumorali devono essere sufficientemente alte da garantire che vengano rilevati nuovi alleli al di sopra della soglia analitica (vedere la Sezione 6.3.10). Le intensità degli alleli per il campione normale devono essere \geq rispetto alla soglia analitica. Accertarsi che il DNA sia stato quantificato e diluito con precisione e ripetere l'amplificazione utilizzando 1,0 ng di DNA modello nel caso in cui venga scoperto un errore di quantificazione. In caso contrario, ripetere l'amplificazione con una quantità superiore di DNA. Se il problema persiste, ripetere il test con il DNA preparato da una sezione di tessuto differente.

Modello di DNA impuro. Le impurità nei campioni di DNA possono inibire la PCR. Consultare le istruzioni del produttore per il metodo di estrazione del DNA selezionato per indicazioni. Se non è possibile ottenere una qualità di DNA sufficiente può essere necessario passare a un metodo di estrazione del DNA diverso. La valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System è stata eseguita utilizzando il DNA purificato estratto dai campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina mediante CRC utilizzando il Maxwell® CSC FFPE DNA Kit. Gli altri metodi potrebbero non fornire la stessa qualità di DNA.

Scarsa iniezione tramite elettroforesi capillare (sono interessati anche i picchi di Size Standard 500). Ripetere l'analisi con elettroforesi capillare per i campioni interessati e i controlli positivi e negativi.

È stata utilizzata della formammide di scarsa qualità. Utilizzare solo fHi-Di™ 3500 Dx Series Formamide.

Elevata concentrazione di sale o pH alterato. Non diluire il modello di DNA FFPE nei tamponi TAE. Utilizzare solo acqua priva di nucleasi per diluire il DNA modello.

Problemi relativi al termociclatore o alla piastra di reazione (era interessata anche la reazione di controllo positivo). Confermare che il programma PCR sia corretto e che il termociclatore selezionato soddisfi i requisiti per l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System (vedere la Sezione 3.5). Potrebbe essere necessaria la calibrazione del blocco di riscaldamento. Utilizzare solo piastre MicroAmp®.

Problema

Altezze di picco ridotte per i campioni normali o tumorali. I campioni tumorali possono presentare un errore di QC del segnale tumorale. (continua)

Cause e commenti

I campioni non sono stati denaturati correttamente prima dell'elettroforesi capillare. Denaturare a caldo i campioni per 3 minuti e raffreddarli su ghiaccio tritato oppure in un bagno di acqua e ghiaccio per almeno tre minuti immediatamente prima dell'elettroforesi capillare.

DNA di scarsa qualità o degradato. Una fissazione non corretta o prolungata dei campioni inclusi in paraffina può dar luogo a estrazioni di DAN ridotte e DNA di bassa qualità. Anche un'errata conservazione del DNA dopo l'estrazione può causare la degradazione del DNA. Ripetere l'amplificazione con una maggiore quantità di DNA oppure ripetere la preparazione del DNA utilizzando una sezione di tessuto diversa.

I componenti per la reazione PCR non sono stati aggiunti sul fondo del pozzetto durante la configurazione della PCR. Prima della termociclazione, centrifugare brevemente la piastra in una minicentrifuga con piastre per portare il contenuto sul fondo dei pozzetti e rimuovere le bolle d'aria.

Il segnale fluorescente per i picchi di allele ha superato il range dinamico dello strumento per l'elettroforesi capillare selezionato

Quantità eccessiva di DNA modello. Accertarsi che il DNA sia quantificato e diluito con precisione. Ripetere l'amplificazione utilizzando 1,0 ng di DNA modello se viene scoperto un errore di quantificazione. In caso contrario, utilizzare uno dei seguenti approcci: 1) ripetere la reazione di amplificazione con una quantità minore di DNA oppure 2) diluire i prodotti di amplificazione con un rapporto di 1:8 in un cocktail di caricamento (vale a dire, 1 µl prodotti di amplificazione più 7 µl di cocktail di caricamento; per la composizione del cocktail di caricamento, vedere la Tabella 4) e ripetere l'analisi con elettroforesi capillare utilizzando 1 µl dei prodotti di amplificazione diluiti. Accertarsi che il metodo di estrazione del DNA sia indicato per i campioni di tessuto FFPE e che il DNA sia stato conservato in modo appropriato per il metodo utilizzato.

Problema

Il segnale fluorescente per i picchi di allele ha superato il range dinamico dello strumento per l'elettroforesi capillare selezionato (continua)

Cause e commenti

Il DNA del campione FFPE è stato degradato o reticolato. I modelli di DNA FFPE degradati o reticolati possono presentare l'amplificazione preferenziale di marker più piccoli, in particolare NR-21. Verificare che le condizioni di preparazione per i campioni FFPE e le condizioni di conservazione degli estratti di DNA FFPE siano corrette. Per indirizzare i campioni fuori scala, è necessario utilizzare uno dei seguenti approcci: 1) ripetere la reazione di amplificazione con una quantità minore di DNA oppure 2) diluire i prodotti di amplificazione con un rapporto di 1:8 in un cocktail di caricamento (vale a dire, 1 µl prodotti di amplificazione più 7 µl di cocktail di caricamento; per la composizione del cocktail di caricamento, vedere la Tabella 4) e ripetere l'analisi con elettroforesi capillare utilizzando 1 µl dei prodotti di amplificazione diluiti. Se il problema persiste, ripetere l'amplificazione con una quantità inferiore di DNA. Potrebbe essere necessario ripetere la preparazione e l'analisi del DNA utilizzando una sezione di tessuto differente.

In uno o più colori erano visibili picchi imprevisti

I picchi stutter erano stati confusi con gli alleli dei microsatelliti. L'amplificazione dei marker dei microsatelliti genera artefatti che appaiono come picchi più piccoli 1 bp al di sopra o al di sotto gli alleli di ripetizione del mononucleotide oppure 0 1 bp o 5 bp al di sopra o al di sotto degli alleli di ripetizione del pentanucleotide. Le altezze di picco dei prodotti stutter saranno superiori nel caso in cui sia stata utilizzata una quantità eccessiva di DNA modello.

Quantità di DNA in eccesso. Utilizzare 1,0 ng di modello di DNA. L'amplificazione di >4 ng di modello di DNA può generare artefatti della linea di base elevati in BAT-26 e un numero più elevato di picchi stutter.

Pull-up o bleedthrough. Il pull-up, altrimenti noto come bleedthrough, può verificarsi in presenza di altezze di picco eccessive o di scarsa qualità della calibrazione spettrale. Ripetere la calibrazione spettrale dello strumento per elettroforesi capillare selezionato. Accertarsi che il DNA sia quantificato e diluito con precisione. Ripetere l'amplificazione utilizzando 1,0 ng di DNA modello. Se il problema persiste, ripetere l'amplificazione con una quantità inferiore di DNA.

Problema

In uno o più colori erano visibili picchi imprevisti
(continua)

Cause e commenti

I campioni non sono stati denaturati correttamente prima del caricamento. Denaturare a caldo i campioni per 3 minuti e raffreddarli su ghiaccio tritato oppure in un bagno di acqua e ghiaccio per almeno tre minuti immediatamente prima dell'elettroforesi capillare.

Artefatti correlati all'elettroforesi capillare. Durante l'elettroforesi capillare possono essere osservati dei picchi aberranti. Accertarsi che il polimero venga riscaldato a temperatura ambiente prima dell'installazione e dell'uso. Ripetere le iniezioni. Se il problema persiste, ripetere l'elettroforesi capillare e l'amplificazione.

Contaminazione del campione di controllo o paziente con un altro DNA modello o prodotto amplificato. La contaminazione crociata può essere un problema. Utilizzare punte delle pipette resistenti all'aerosol e cambiare i guanti regolarmente.

Un campione di tumore instabile è stato analizzato erroneamente come campione di riferimento normale. Verificare che i campioni siano stati identificati ed etichettati correttamente. Ripetere l'amplificazione e l'elettroforesi capillare dei campioni interessati per confermare la causa principale sospettata.

Amplificazione preferenziale dei marker più piccoli

Il DNA era stato reticolato. Il DNA preparato da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina spesso viene reticolato con altro DNA o altre molecole proteiche, impedendo l'amplificazione dei frammenti di DNA più lunghi. Ripetere l'amplificazione utilizzando una maggiore quantità di DNA. Se con una maggiore quantità di DNA si osserva la saturazione dei marker più piccoli, ripetere l'analisi dell'estrazione del DNA e dei campioni utilizzando una sezione di tessuto diversa. Se il problema persiste, la qualità del campione di tessuto FFPE potrebbe essere troppo bassa per il successo dell'analisi.

Problema
Cause e commenti

Amplificazione preferenziale dei marker più piccoli
(continua)

DNA degradato. Il modello di DNA è stato degradato in frammenti più piccoli, con marker più grandi che mostrano una resa ridotta. Verificare che le condizioni di conservazione dei campioni di 2800M Control DNA e dei campioni di DNA FFPE siano corrette. Ripetere la reazione di amplificazione utilizzando una maggiore quantità di DNA. Se con una maggiore quantità di DNA si osserva la saturazione dei marker più piccoli, ripetere l'analisi dell'estrazione del DNA e dei campioni utilizzando una sezione di tessuto diversa. Se il problema persiste, la qualità del campione di tessuto FFPE potrebbe essere troppo bassa per il successo dell'analisi.

DNA modello insufficiente. Accertarsi che il DNA sia stato quantificato e diluito con precisione e ripetere l'amplificazione utilizzando 1,0 ng di DNA modello nel caso in cui venga scoperto un errore di quantificazione. Se il problema persiste, ripetere la reazione di amplificazione con una maggiore quantità di DNA oppure ripetere la preparazione del DNA utilizzando una sezione di tessuto diversa.

Uno o più alleli di pentanucleotide presenti nel campione normale erano assenti dal campione tumorale

I campioni di DNA normali e quelli tumorali di diversi individui sono stati analizzati come coppia di campioni. Accertarsi che i campioni normali o i campioni tumorali provenienti dal campione tumorale siano stati accoppiati correttamente sulla piastra PCR durante l'analisi dell'elettroforesi capillare. Accertarsi che i campioni siano etichettati correttamente. Ripetere l'analisi con elettroforesi capillare dei campioni interessati con l'associazione corretta dei campioni, incluse le reazioni dei controlli positivi e negativi. Se il problema persiste, ripetere le reazioni di amplificazione.

Il campione tumorale presenta una perdita di eterozigotità. Per ulteriori informazioni sull'interpretazione dei dati di questi campioni tumorali, vedere la Sezione 6.5.3 e la Figura 13.

10. Bibliografia

1. Bacher, J.W. *et al.* (2004) Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis. Markers* **20**, 237–50.
2. Beamer, L.C. *et al.* (2012) Reflex immunohistochemistry and microsatellite instability testing of colorectal tumors for Lynch syndrome among US cancer programs and follow-up of abnormal results. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1058-63.
3. Berg, A.O. *et al.* (2009) Recommendations from the EGAPP Working Group: Genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet. Med.* **11**, 35-41.
4. Boland, C.R. and Goel, A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–87.
5. Boland, C.R. *et al.* (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 5248-57.
6. Bregu J. *et al.* (2013) Analytical thresholds and sensitivity: Establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J. Forensic Sci.* **58**, 120–9
7. Cortes-Ciriano I. *et al.* (2017) A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat. Commun.* **8**, 15180.
8. Hampel, H. *et al.* (2005) Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N. Engl. J. Med.* **352**, 1851-60.
9. Hampel, H. *et al.* (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5783-8.
10. Hause R.J. *et al.* (2016) Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat. Med.* **22**, 1342-50.
11. Ionov Y. *et al.* (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–61.
12. Latham A. *et al.* (2019) Microsatellite instability is associated with the presence of Lynch syndrome pan-cancer. *J. Clin. Oncol.* **37**, 286-95.
13. Le, D.T. *et al.* (2015) PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509-20.
14. Le, D.T. *et al.* (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409–13.
15. Luchini, C. *et al.* (2019) ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: A systematic review-based approach. *Ann. Oncol.* **8**, 1232-43.
16. Lynch, H.T. and Chapelle, A. (2003) Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919-32.

17. Matloff, J. *et al.* (2013) Molecular tumor testing for Lynch syndrome in patients with colorectal cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **11**, 1380-5.
18. Overman, M.J. *et al.* (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): An open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **18**, 1182-91.
19. Linee guida sulle prassi cliniche NCCN in oncologia, cancro al colon versione 3.2019.
20. Linee guida sulle prassi cliniche NCCN in oncologia, neoplasia uterina versione 4.2019.
21. Rubenstein, J.H. *et al.* (2015) American Gastroenterological Association Institute guideline on the diagnosis and management of Lynch syndrome. *Gastroenterology* **149**, 777–82.
22. Sepulveda, A.R. *et al.* (2017) Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1453-86.
23. Southern, E.M. (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **100**, 319-23.
24. Stjepanovic, N. *et al.* (2019) Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* mdz233.
25. Stoffel E.M. *et al.* (2015) Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J. Clin. Oncol.* **33**, 209–17.
26. Timmermann, B. *et al.* (2010) Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis. *PLoS ONE* **5**, e15661.
27. Umar, A. *et al.* (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 261-8.
28. Wang Y. *et al.* (2017) Differences in microsatellite instability profiles between endometrioid and colorectal cancers: A potential cause for false-negative results? *J. Mol. Diagn.* **19**, 57-64.



11. Informazioni aggiuntive

Le informazioni relative ai contatti sono disponibili all'indirizzo: **www.promega.com**; e-mail: **genetic@promega.com**

11.1 Appendice A

Di seguito sono mostrate le impostazioni per la calibrazione spettrale utilizzate durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System con l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.

Le seguenti impostazioni sono indicate per completare la calibrazione spettrale mediante gli Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers:

Dye set template (Modello di set di coloranti): AnyDye (3500 Series)

Dye order (Ordine coloranti): 5, blue; 4, green; 3, yellow; 2, red; 1, orange (purple deselezionato)

Matrix Condition Number Upper Limit (Limite superiore numero di condizioni matrice): 8,0

Locate Start Point After Scan (Individua punto iniziale dopo la scansione): 300

Locate Start Point Before Scan (Individua punto iniziale prima della scansione): 5000

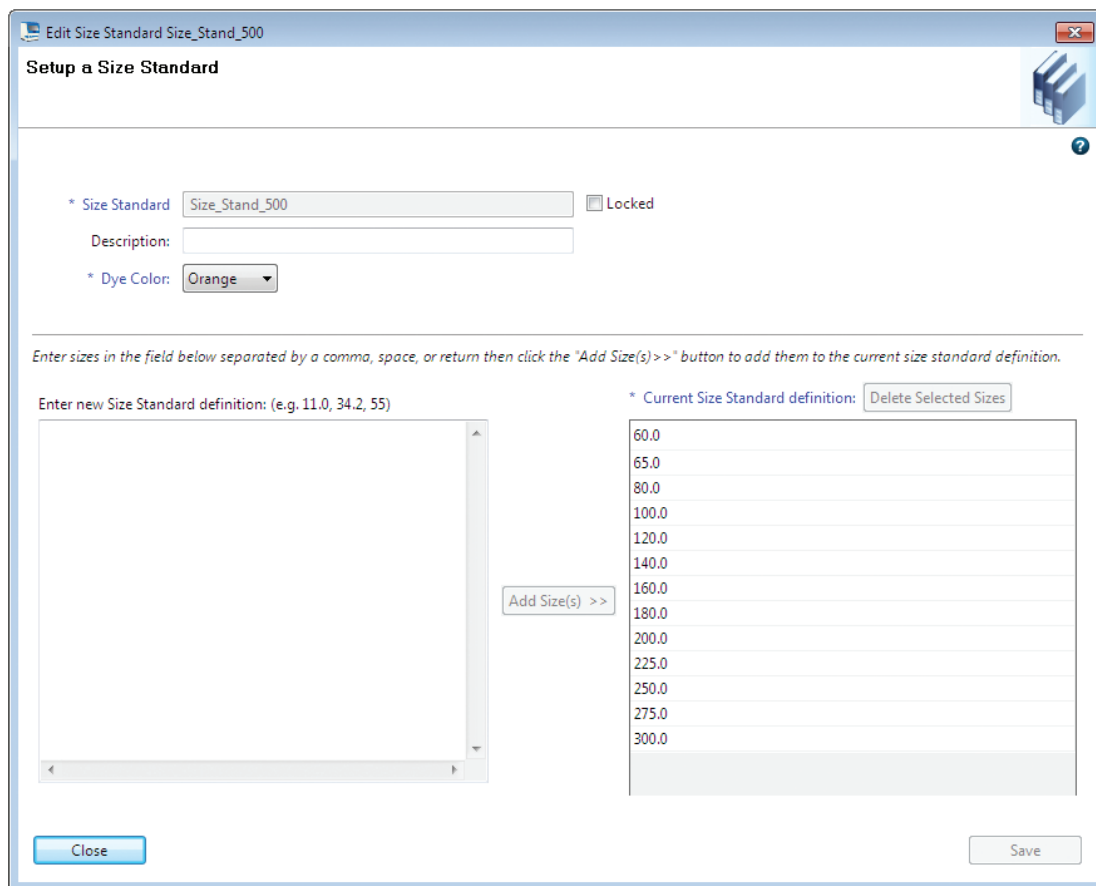
Limit Scans To (Limita scansioni a): 6500

Sensitivity (Sensibilità): 0,4

Minimum Quality Score (Punteggio qualità minimo): 0,95

11.2 Appendice B

Di seguito sono mostrate le impostazioni per l'analisi dei frammenti utilizzate durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System con l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.



The screenshot shows a software window titled "Edit Size Standard Size_Stand_500" with the following fields and controls:

- Size Standard:** A text box containing "Size_Stand_500" and a "Locked" checkbox.
- Description:** An empty text box.
- Dye Color:** A dropdown menu set to "Orange".
- Instructions:** "Enter sizes in the field below separated by a comma, space, or return then click the 'Add Size(s) >>' button to add them to the current size standard definition."
- Input Area:** A large text box for "Enter new Size Standard definition: (e.g. 11.0, 34.2, 55)".
- Current Definition:** A list of size values from 60.0 to 300.0 in increments of 5.0, with a "Delete Selected Sizes" button above it.
- Buttons:** "Add Size(s) >>" between the input and current definition areas, "Close" at the bottom left, and "Save" at the bottom right.

16190TA

Figura 14. Definizione "Size Standard" (Standard di dimensioni) dello strumento per l'elettroforesi capillare.

Edit Instrument Protocol FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDye_11s

Setup an Instrument Protocol

Instrument Protocol Setup Help ?

Application Type: Capillary Length: cm Polymer:

Dye Set: Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

* Run Module: Run Modules for 8 capillary are only available in the list.

* Protocol Name: Locked

Description:

Oven Temperature (°C): Run Voltage (kVolts): PreRun Voltage (kVolts): Injection Voltage (kVolts):

Run Time (sec.): PreRun Time (sec.): Injection Time (sec.): Data Delay (sec.):

Advanced Options
Following values are not recommended to be changed.

Voltage Tolerance (kVolts): Voltage # of Steps (nk): Voltage Step Interval (sec.):

First Read Out Time (ms): Second Read Out Time (ms):

Normalization Target: Normalization Factor Threshold Min: Normalization Factor Threshold Max:

16191TA

Figura 15. Impostazioni "Instrument Protocol" (Protocollo strumento) dello strumento per l'elettroforesi capillare.

Edit Sizecalling Protocol Fragment_Analysis_MSI

Setup a Sizecalling Protocol

* Protocol Name: Locked

Description:

Size Standard:

Sizecaller:

Analysis Settings QC Settings

Analysis Range: Sizing Range: Size Calling Method:

Analysis Start Point: Sizing Start Size: Primer Peak:

Analysis Stop Point: Sizing Stop Size:

<input checked="" type="checkbox"/> Blue	<input checked="" type="checkbox"/> Green	<input checked="" type="checkbox"/> Yellow	<input checked="" type="checkbox"/> Red	<input type="checkbox"/> Purple	<input checked="" type="checkbox"/> Orange
Minimum Peak Height	175	175	175	175	175

Common Settings

Use Smoothing:

Use Baseline (Baseline Window (Pts))

Minimum Peak Half Width:

Peak Window Size:

Polynomial Degree:

Slope Threshold Peak Start:

Slope Threshold Peak End:

16192TA

Figura 16. Impostazioni "Sizecalling Protocol" (Protocollo di taratura) dello strumento per l'elettroforesi capillare.

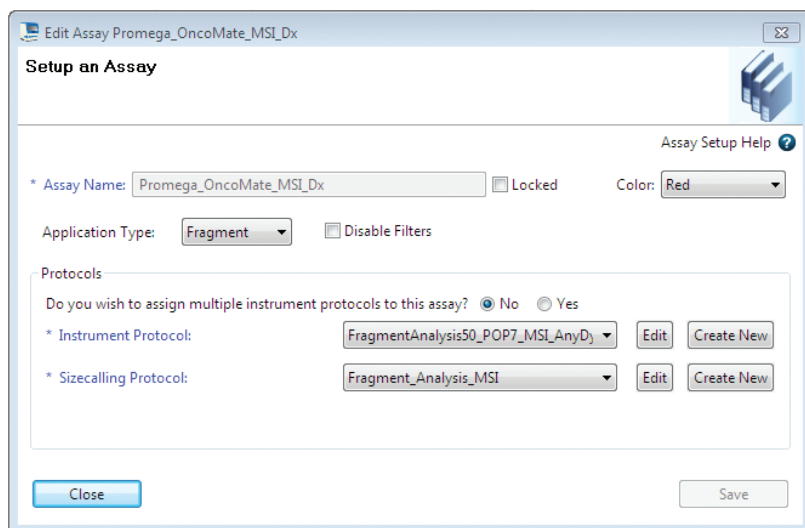


Figura 17. Impostazioni "Assay" (Test) dello strumento per l'elettroforesi capillare.

11.3 Appendice C

Impostazioni di analisi dei dati per GeneMapper® 5.0 utilizzate durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

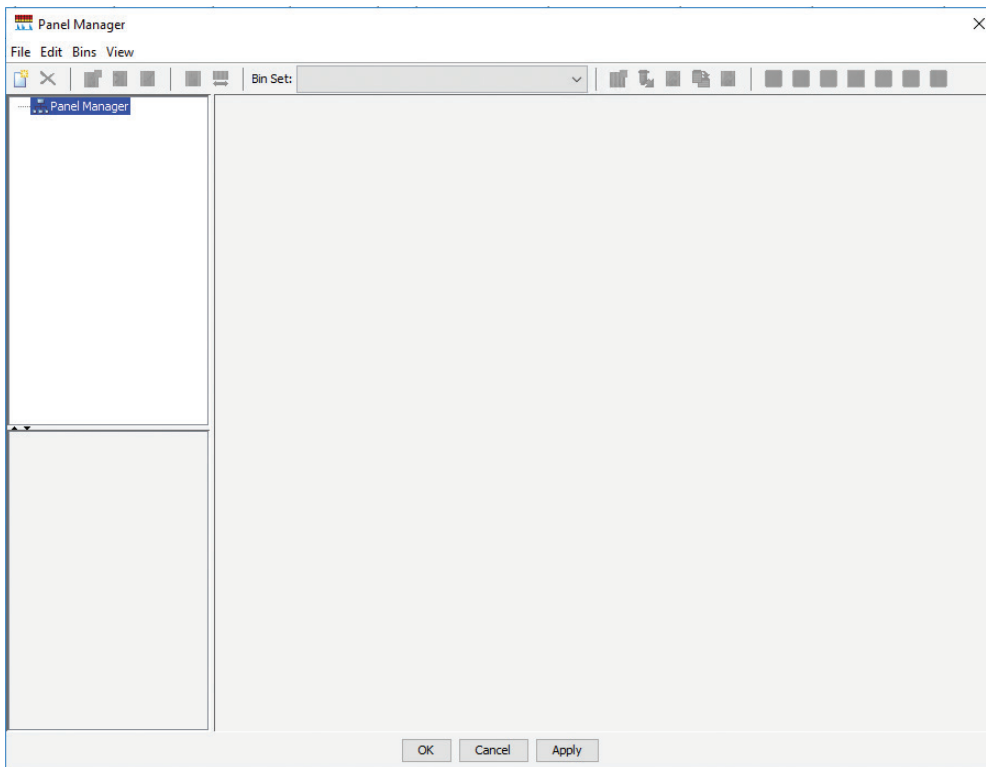
Nota: i file delle impostazioni di GeneMapper® e le istruzioni per l'analisi dei dati sono fornite per comodità e si applicano in modo specifico ai dati dell'elettroforesi capillare generati utilizzando una matrice di 50 cm e il POP-7® Polymer. Gli utenti che analizzano i prodotti amplificati dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System con altre configurazioni dello strumento per l'elettroforesi capillare devono verificare l'appropriatezza delle istruzioni di analisi dei dati alla configurazione dello strumento specifico utilizzato. I metodi di analisi creati dall'utente possono essere più indicati per una determinata configurazione dello strumento.

Importazione dei file di impostazioni per GeneMapper

Per facilitare l'analisi dei dati generati con l'OncoMate™ MSI Dx Analysis System, abbiamo creato dei file (Pannelli), Analysis Method (Metodo di analisi), Size Standard (Standard di dimensioni), Plot Settings (Impostazioni grafico), Table Settings (Impostazioni tabella) e Report Settings (Impostazioni report) per importare GeneMapper® Software versioni 5.0 e 6.0. Tali file sono disponibili dal sito web Promega all'indirizzo:

www.promega.com/OncomatePanels. Di seguito sono fornite anche le definizioni di Pannelli (Pannelli), Size Standard (Standard di dimensioni) e Analysis Method (Metodo di analisi) (Tabelle 9 e 10, Figura 19). Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla letteratura associata a GeneMapper® Software versioni 5.0 e 6.0.

1. Aprire il GeneMapper® Software, versione 5.0 o 6.0.
2. Selezionare **Tools** (Strumenti), quindi **Panel Manager** (Gestione pannelli).
3. Selezionare **Panel Manager** (Gestione pannelli) nel riquadro superiore sinistro (Figura 18).
4. Dal menu selezionare **File**, quindi **Import Panels** (Importa pannelli). Affinché l'opzione **Import Panels** (Importa pannelli) sia disponibile per la selezione, è necessario selezionare l'icona Panel Manager.
5. Andare al percorso file del computer in cui è stato salvato il file di testo dei pannelli. Selezionare il file **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Pannelli_v1.0), quindi fare clic su **Import** (Importa).
6. In fondo alla finestra Panel Manager (Gestione, pannelli) selezionare **Apply** (Applica) quindi **OK**.
7. Selezionare **Tools** (Strumenti), quindi **GeneMapper Manager** (Gestione GeneMapper).
8. Selezionare la scheda "Size Standards" (Standard di dimensioni), quindi selezionare **Import** (Importa) in fondo alla finestra GeneMapper Manager (Gestione GeneMapper).
9. Andare al percorso file del computer in cui è stato salvato il file Size Standard (Standard di dimensioni). Selezionare **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Dimensioni_v1.0), quindi **Import** (Importa).
10. Con GeneMapper Manager (Gestione GeneMapper) ancora aperto, ripetere il processo descritto ai passaggi 8 e 9 per importare i restanti file delle impostazioni (Analysis Method (Metodo analisi), Plot Settings (Impostazioni grafico), Table Settings (Impostazioni tabella) e Report Settings (Impostazioni report)).
11. Quando tutti i file di impostazioni vengono importati, selezionare **Done** (Fatto) in fondo alla finestra GeneMapper Manager (Gestione GeneMapper).



16194TA

Figura 18. La finestra di GeneMapper® Panel Manager, con l'icona Panel Manager (Gestione pannelli) selezionata. L'opzione "Import Panels" (Importa pannelli) (Passaggio 4) è accessibile dal menu "File" quando l'icona Panel Manager (Gestione pannelli) viene selezionata (evidenziata in blu).

Tabella 9. Definizione del pannello dei marker.

Marker	Canale di colore	Range pannello (bp) ¹		Tipo di ripetizione ²
		Inizio	Fine	
BAT-26	blu	83	121	1
Penta D	blu	123	253	5
NR-21	verde	83	108	1
BAT-25	verde	110	132	1
MONO-27	verde	134	168	1
NR-24	giallo	103	138	1
Penta C	giallo	140	228	5

¹L'intervallo di dimensioni previsto per gli ampliconi in ciascun marker deve essere definito nel software di analisi dei frammenti selezionato.

²Il tipo di microsatellite viene definito in questa tabella come 1 (per i marker di ripetizione del mononucleotide) e 5 (per i marker di ripetizione del pentanucleotide).

Tabella 10. Definizione di Size Standard. Size Standard 500 contiene picchi di frammenti da 60 bp a 500 bp, sebbene l'analisi del picco di frammenti da 60 bp a 300 bp sia sufficiente al dimensionamento dei frammenti OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

N. di frammenti standard di dimensione	Dimensione frammenti (bp)
1	60
2	65
3	80
4	100
5	120
6	140
7	160
8	180
9	200
10	225
11	250
12	275
13	300

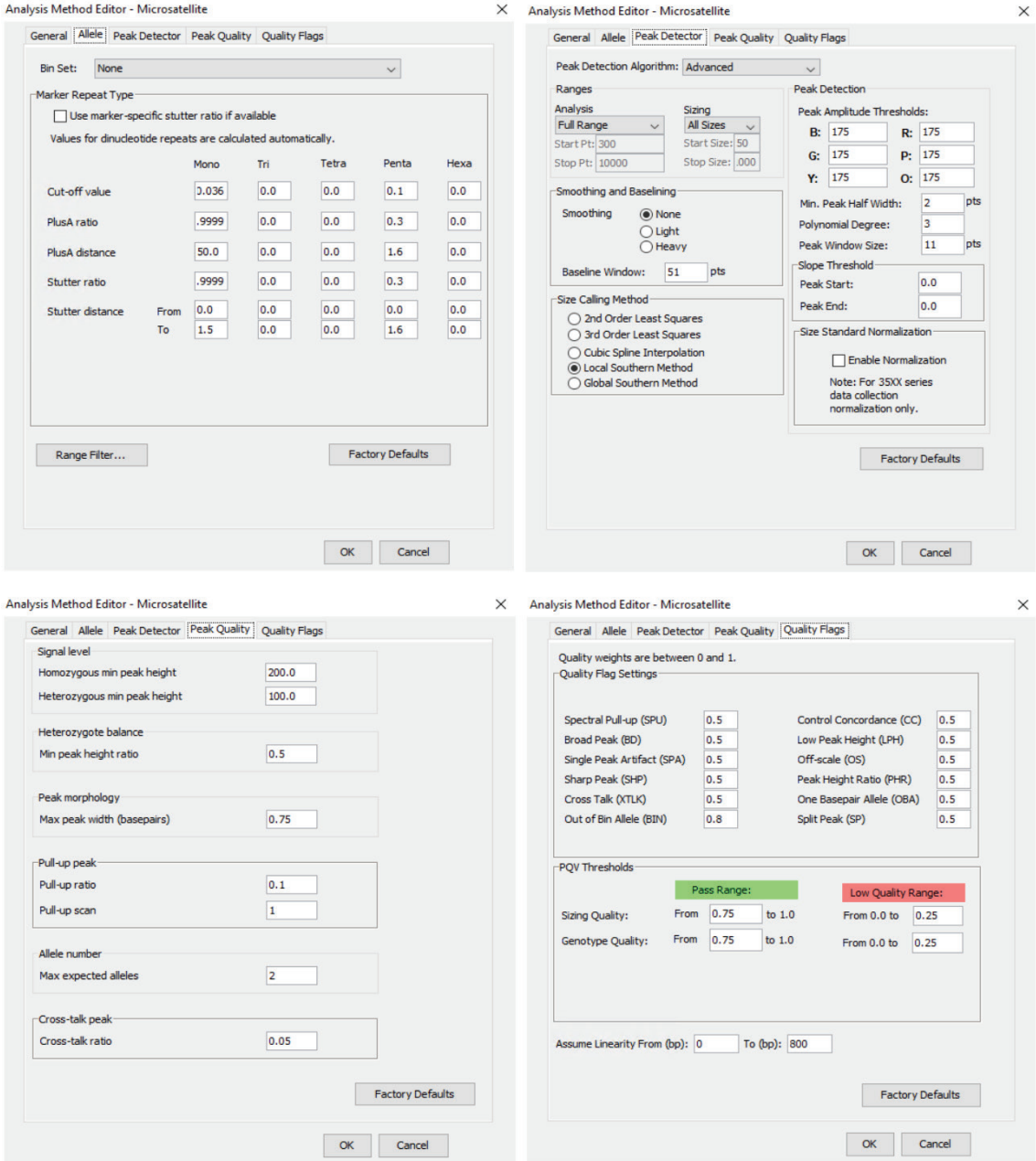


Figura 19. Impostazioni di analisi utilizzate durante la valutazione delle prestazioni dell'OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

^(a) Brevetto USA n. 9.139.868, brevetto europeo n. 2972229 e altri brevetti in corso di rilascio.

^(b) I colori TMR-ET, CXR-ET e WEN sono di proprietà.

© 2019 Promega Corporation. Tutti i diritti riservati.

GoTaq e Maxwell sono marchi registrati di Promega Corporation. OncoMate è un marchio di Promega Corporation.

Applied Biosystems, GeneMapper e Veriti sono marchi registrati di Applied Biosystems. MasterCycler è un marchio registrato di Eppendorf.

Hi-Di è un marchio di Applera Corporation. C1000 Touch è un marchio di Bio-Rad Laboratories, Inc. MicroAmp e POP-7 sono marchi registrati di Thermo Fisher Scientific.

I prodotti possono essere coperti da brevetti già rilasciati o in corso di rilascio o possono essere soggetti a determinate limitazioni. Per ulteriori informazioni visitare il nostro sito Web. Specifiche e prezzi sono soggetti a modifica senza preavviso.

Le descrizioni dei prodotti sono soggette a modifica. Per informazioni aggiornate sui prodotti Promega rivolgersi all'assistenza tecnica Promega oppure consultare il catalogo Promega online.