

INSTRUKCJA TECHNICZNA

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Instrukcja użytkowania produktu
MD3140




PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA

EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanower, Niemcy



INSTRUKCJA
UŻYTKOWANIA
PRODUKTU

MD3140



Wer. 0
TM595

System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1.	Wprowadzenie.....	3
1.1	Informacje ogólne na temat systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System	3
1.2	Nazwa produktu	4
1.3	Skróty i definicje.....	5
1.4	Objaśnienie stosowanych symboli	6
1.5	Przeznaczenie.....	7
1.6	Podstawowe informacje	8
1.7	Zasada badania.....	9
2.	Składniki produktu i warunki przechowywania	14
2.1	Materiały dostarczane w zestawie z systemem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System (nr kat. MD3140)	14
2.2	Przechowywanie systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System i obchodzenie się z nim ..	15
2.3	Materiały niedostarczane	15
3.	Przed rozpoczęciem.....	16
3.1	Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	16
3.2	Wymogi dotyczące próbek.....	17
3.3	Metody ekstrakcji DNA i wymogi dotyczące jakości DNA.....	17
3.4	Wymogi dotyczące ilości DNA.....	18
3.5	Wymogi dotyczące termocyklera	18
3.6	Wymogi dotyczące aparatu do elektroforezy kapilarnej	18
3.7	Wymogi dotyczące kalibracji spektralnej aparatu do elektroforezy kapilarnej	19
3.8	Wymogi dotyczące oprogramowania do analizy danych.....	19
3.9	Wymogi dotyczące wartości progowej analizy	20
4.	Protokół oznaczenia	21
4.1	Rozcieńczanie DNA wyekstrahowanego z tkanek FFPE	21
4.2	Rozcieńczanie kontrolnego DNA 2800M Control DNA.....	22
4.3	Przygotowywanie reakcji amplifikacji przeprowadzanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System	23
4.4	Cykle termiczne	24
4.5	Przygotowanie aparatu do elektroforezy kapilarnej	26
4.6	Przygotowanie fragmentów zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System do analizy metodą elektroforezy kapilarnej	26
4.7	Wykrywanie zamplifikowanych fragmentów metodą elektroforezy kapilarnej z detekcją fluorescencyjną	27

5.	Analiza danych.....	28
5.1	Wprowadzenie	28
5.2	Analiza danych	30
6.	Przegląd i interpretacja wyników.....	32
6.1	Interpretacja danych wygenerowanych przez system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System	32
6.2	Podsumowanie znanych artefaktów amplifikacji oraz anomalii elektroforezy kapilarnej	35
6.3	Wymogi dotyczące kontroli jakości interpretacji danych	36
6.4	Określanie stabilności markerów powtórzeń mononukleotydów.....	46
6.5	Interpretacja statusu MSI guza	49
7.	Kontrole jakości oznaczenia	54
7.1	Kalibracja spektralna	54
7.2	Próbka zdrowej tkanki odpowiadająca próbce tkanki guza	54
7.3	Kontrola dodatnia i kontrola ujemna.....	54
7.4	Standardy do elektroforezy kapilarnej	55
7.5	Wartość progowa analizy	55
8.	Ograniczenia szczególne	56
9.	Rozwiązywanie problemów.....	57
10.	Bibliografia.....	66
11.	Informacje dodatkowe.....	68
11.1	Załącznik A	68
11.2	Załącznik B	69
11.3	Załącznik C	73

1. Wprowadzenie

1.1 Informacje ogólne na temat systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System

W niniejszym podręczniku opisano system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Podręcznik zawiera podstawowe informacje o przeznaczeniu systemu, jego elementach składowych, ograniczeniach, stosowanym protokole, rozwiązywaniu problemów itp. System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System to posiadający oznakowanie CE wyrób medyczny do diagnostyki in vitro (IVD), w którym oznaczenie fluorescencyjne oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wykorzystuje się w ramach szerzej rozumianych procedur laboratoryjnych (rysunek 1) w celu przeanalizowania próbek tkanek utrwalonych w parafinie (FFPE) pod kątem niestabilności mikrosatelitarnej (MSI).

 Do przeprowadzenia analizy produktów zamplifikowanych przy użyciu systemu OncoMate™ MSI Dx Analysis System metodą elektroforezy kapilarnej wymagany jest standard matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard (nr kat. MD3850). Sposób obsługi standardu matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard opisano w instrukcji technicznej *standardu matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard* nr TM597.

Pełna procedura, w ramach której wykorzystuje się system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System, polega na ekstrakcji DNA z próbki tkanki utrwalonej w parafinie (FFPE), oznaczeniu ilościowym DNA, amplifikacji określonych markerów mikrosatelitarnych przy użyciu multipleksu PCR, analizie zamplifikowanych fragmentów DNA metodą elektroforezy kapilarnej oraz analizie danych z elektroforezy kapilarnej fragmentów DNA przy użyciu odpowiedniego oprogramowania. Użytkownicy systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System muszą dobrać odpowiednie elementy procedury w oparciu o wymogi przedstawione w części 3. Dodatkowe informacje można znaleźć w dokumentacji technicznej dotyczącej wybranej metody ekstrakcji DNA, metody oznaczenia ilościowego DNA, termocyklera, aparatu do elektroforezy kapilarnej i oprogramowania do analizy fragmentów DNA.



Izolowanie DNA.



Oznaczanie ilościowe DNA.

Odczynniki, aparaty do fluorescencyjnej analizy ilościowej DNA lub jedno i drugie (patrz część 1.7)



Amplifikacja DNA.

System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System (nr kat. MD3140, TM595)
Termocykler zdolny do zmiany temperatury z szybkością 3,9–5°C/sekundę



Kalibracja spektrum barwników.

Standardy matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard (nr kat. MD3850, TM597)



Rozdzielanie i wykrywanie.

Analizator genetyczny Applied Biosystem® 3500 Dx Genetic Analyzer
lub porównywalny aparat do elektroforezy kapilarnej



Analiza i interpretacja danych.

Oprogramowanie do analizy fragmentów

152077B

Rysunek 1. Procedura laboratoryjna, w ramach której wykorzystuje się system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

1.2 Nazwa produktu

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

nr kat. MD3140, 100 reakcji



1.3 Skróty i definicje

bp — para zasad

CRC — rak jelita grubego

DCS — oprogramowanie do gromadzenia danych

dMMR — niezgodność deficytu naprawczego

dsDNA — łańcuch dwuniciowy DNA

ESMO — Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej

FFPE — tkanka utrwalona w parafinie

HNPCC — dziedziczny rak jelita grubego bez polipowatości

ICI — immunologiczny inhibitor punktu kontrolnego

LOH — utrata heterozygotyczności

MMR — mechanizm naprawy błędnie sparowanych zasad

MSI — niestabilność mikrosatelitarna

MSI-H — wysoka niestabilność mikrosatelitarna: wynik interpretacyjny próbki, gdy co najmniej dwa markery są niestabilne

MSS — stabilny mikrosatelitarnie: wynik interpretacyjny próbki, gdy mniej niż dwa markery są niestabilne

PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy

RFU — względne jednostki fluorescencji

QC — kontrola jakości

NA — nie dotyczy

Allel: jedna z dwóch lub większej liczby postaci markera DNA (np. różniących się długością)

Przeciek: artefakt elektroforezy kapilarnej rejestrowany, gdy piki z jednego kanału barwnika zostają wykryte na drugim kanale barwnika przy zbliżonej wielkości (liczbie par zasad, bp) fragmentów; zwany również „pikiem podciągniętym”

Marker DNA: sekwencja będąca przedmiotem zainteresowania w obrębie genomu

Heterozygotyczny: allele markera DNA różnią się

Homozygotyczny: oba allele markera DNA mają tę samą postać

Powtórzenie mononukleotydów: struktura DNA, w której ta sama zasada nukleotydowa jest powtórzona

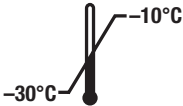
Quasi-monomorficzny: marker DNA, w przypadku którego większość osobników jest homozygotyczna pod względem tego samego powszechnie występującego allelu

Stabilny: nie stwierdzono zmiany wielkości allelu wskazującej na niezgodność deficytu naprawczego

Pik satelitarny: artefakt reakcji PCR spowodowany poślizgiem polimerazy w trakcie replikacji DNA w warunkach in vitro. Piki satelitarne to jedna lub większa liczba powtarzających się jednostek, które są krótsze lub dłuższe niż prawdziwy pik allelu

Niestabilny: stwierdzono zmianę wielkości allelu wskazującą na niezgodność deficytu naprawczego

1.4 Objaśnienie stosowanych symboli

Symbol	Objaśnienie	Symbol	Objaśnienie
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Autoryzowany przedstawiciel
	Przechowywać w temperaturze od -30°C do -10°C		Wytwórca
	Conformité Européenne		Środek drażniący
	Numer katalogowy		Numer serii
	Nie używać ponownie		Zawiera ilość wystarczającą do przeprowadzenia <n> badań
	Data ważności		Chronić przed światłem
	Sprawdź w instrukcji użytkowania		

1.5 Przeznaczenie

OncoMate™ MSI Dx Analysis System to oparty na reakcji PCR test do wymiarowania fragmentów DNA w celu określenia statusu niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) oczyszczonego DNA wyekstrahowanego z utrwalonych w parafinie (FFPE) próbek ludzkich tkanek guzów litych.

System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System tworzy profile alleliczne na podstawie analizy utrwalonych w parafinie próbek tkanek guza i zdrowych tkanek pobranych od tego samego pacjenta. W tym celu przeprowadza się amplifikację markerów mikrosatelitarnych DNA metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), po czym zamplifikowane markery są rozdzielane według wielkości przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Status MSI określa się, porównując profile alleliczne. Wydłużenie lub skrócenie repetytywnych sekwencji w DNA komórki nowotworowej w porównaniu do DNA zdrowej komórki pobranej od tego samego pacjenta oznacza MSI. Aby uzyskać prawidłowe wyniki, zdrowa tkanka i tkanka guza pobrane od tego samego pacjenta muszą być badane w tym samym czasie, a dane dotyczące obu próbek muszą być dostępne do porównania.

System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System nie jest przeznaczony do diagnozowania konkretnych chorób. System ten jest przeznaczony do użycia w przypadku pacjentów, u których już zdiagnozowano raka, a którzy mogą skorzystać z dodatkowych badań genetycznych. Wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu niniejszego wyrobu muszą być interpretowane przez pracowników służby zdrowia z uwzględnieniem innych danych klinicznych, wywiadu rodzinnego i danych laboratoryjnych. Produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.

1.6 Podstawowe informacje

Mikrosatelity to krótkie repetytywne sekwencje DNA składające się z powtarzających się jednostek o długości od jednego do sześciu nukleotydów [np. (A)_n, (CA)_n, (AAAAG)_n]. Sekwencje mikrosatelitarne są rozmieszczone w różnych miejscach w obrębie ludzkiego genomu i wykazują tendencję do błędów insercji i delecji podczas replikacji DNA. Zazwyczaj takie błędy są naprawiane przez mechanizm naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) komórkowego DNA. MSI obserwuje się w przypadku niezgodności deficytu naprawczego, gdy błędy replikacji DNA nie zostają naprawione. Wówczas allele mikrosatelitarne w próbkach tkanek z niezgodnością deficytu naprawczego i próbkach zdrowych tkanek mają różną długość (Bacher, 2004; Boland, 2010; Ionov, 1993; Umar, 2004; Wang, 2017). Mikrosatelitami, które najczęściej wykazują niestabilność, są powtórzenia mononukleotydów (Bacher, 2004; Ionov, 1993). Za niestabilność mikrosatelitarną może odpowiadać kilka mechanizmów, takich jak mutacja somatyczna i mutacja linii zarodkowej genów MMR oraz zmiany w regionach promotorowych genów MMR. U osobników z wadami MMR nagromadzenie mutacji może prowadzić do zaburzenia funkcji komórkowych, a w konsekwencji do rozwoju raka (Boland, 2010; Le, 2015; Timmermann, 2010).

Niestabilność mikrosatelitarna jest silnie skorelowana z zespołem Lyncha. Zespół Lyncha to zaburzenie dziedziczone autosomalnie dominująco, wywołwane przez mutacje linii zarodkowej w dowolnym z czterech głównych genów MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Oznacza predyspozycję do rozwoju raka. Identyfikacja osób z zespołem Lyncha umożliwia wczesne wykrycie raka i interwencję w takim stadium rozwoju choroby, w którym łatwiej zwiększyć szanse na przeżycie. Na poziomie genomu wadliwy gen MMR skutkuje utratą ekspresji lub funkcji kodowanego białka MMR. Niestabilność mikrosatelitarna wynika z niezgodności deficytu naprawczego, a przy uwzględnieniu historii choroby i wywiadu rodzinnego wskazuje na podatność genetyczną. Do często występujących nowotworów powiązanych z zespołem Lyncha należą m.in. rak jelita grubego i rak błony śluzowej trzonu macicy; jednakże zespół Lyncha stwierdzono w przypadku niemal wszystkich rodzajów guzów litych (Cortes-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018). Wiele stowarzyszeń onkologii klinicznej, w tym Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej (ESMO; Stjepanovic, 2019), Narodowy Program Zwalczania Chorób Nowotworowych (CRC, EC) i Amerykańskie Towarzystwo Onkologiczne (Sepulveda, 2017; Stoffel, 2015), popiera ideę powszechnych badań przesiewowych pacjentów z rakiem jelita lub rakiem błony śluzowej trzonu macicy pod kątem MSI, aby umożliwić wytypowanie kandydatów do dalszych badań genetycznych pod kątem zespołu Lyncha.

Niedawno niestabilność mikrosatelitarną powiązano z odpowiedzią na leki będące immunologicznymi inhibitorami punktu kontrolnego (ICI) (Le, 2015; Overman, 2017). Terapie ICI są ukierunkowane na receptory immunosupresyjne lub ich ligandy, a przy odpowiednim leczeniu komórki układu odpornościowego pacjenta skuteczniej zwalczają raka. Z uwagi na wadliwe funkcjonowanie MMR w DNA guzy o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej (MSI-H) ulegają hipermutacji i wytwarzają więcej antygenów nowotworowych lub nowych epitopów, z których niektóre uważa się za immunogenne i wywołujące odpowiedź immunologiczną na raka (Le, 2017). W efekcie guzy MSI-H są często antygeniczne i wykazują większą infiltrację limfocytową — w takiej sytuacji istnieje prawdopodobieństwo, że pacjent odpowie na leczenie ICI. Identyfikacja pacjentów, którzy mogliby skorzystać z tego leczenia, oferuje pracownikom służby zdrowia dodatkowe możliwości, a także stanowi źródło dodatkowych informacji. MSI zaobserwowano w przypadku wielu rodzajów guza (Cortes-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018), a odpowiedź na ICI wykazały guzy MSI-H pochodzące z wielu różnych pierwotnych ognisk nowotworowych (Le, 2015). Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej (ESMO) dostrzegło znaczenie badań pod kątem MSI i niezgodności deficytu naprawczego dla wsparcia procesu kwalifikacji pacjentów do terapii ICI i podsumowało swoje zalecenia dotyczące badań MSI

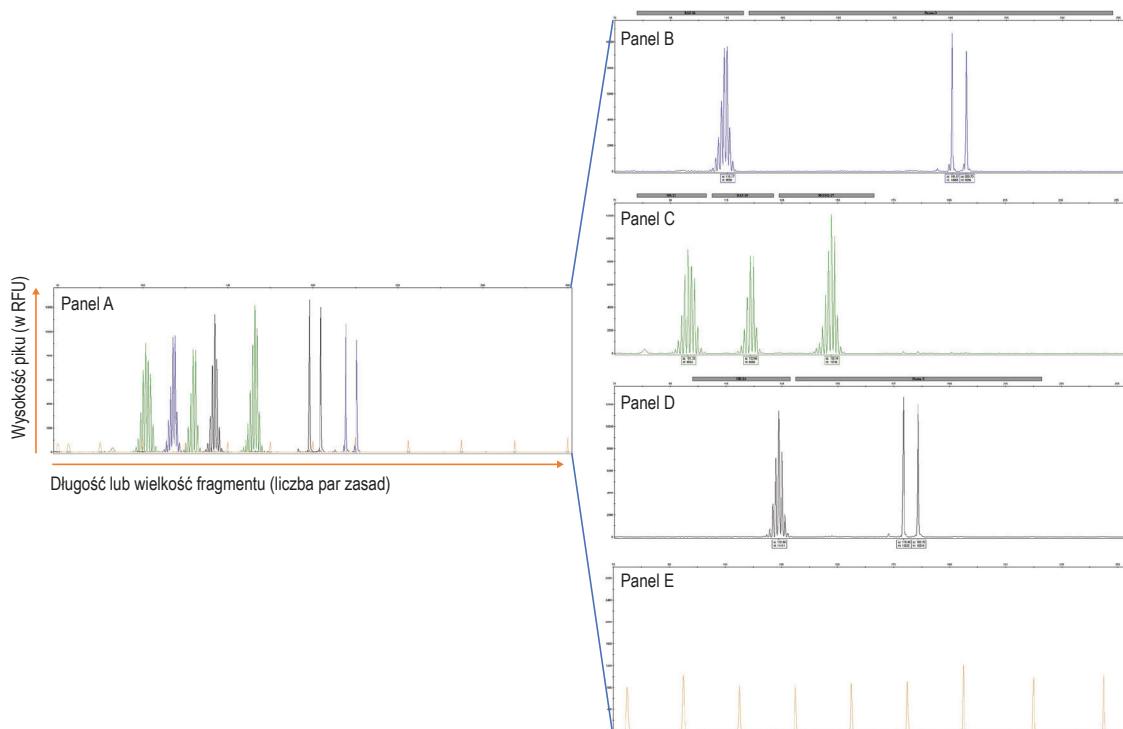
przeprowadzanych w tym celu (Luchini, 2019, Stjepanovic, 2019). Grupa Robocza ds. Badań Translacyjnych i Medycyny Precyzyjnej ESMO zaleca przeprowadzanie badań MSI guzów ze spektrum zespołu Lyncha z uwagi na potencjalną przydatność ICI w leczeniu tych rodzajów raka. Ponadto zidentyfikowanie zespołu Lyncha może przynieść korzyść również członkom dalszej rodziny. Zaleca się, aby analiza MSI z wykorzystaniem reakcji PCR oraz analiza dMMR metodą IHC były przeprowadzane łącznie, ponieważ w przeszłości odnotowywano wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich testów opracowanych lokalnie na potrzeby laboratorium. Ponadto komitet zaleca stosowanie paneli złożonych z pięciu markerów powtórzeń mononukleotydów z uwagi na ich wyższą czułość i specyficzność w porównaniu do paneli zawierających markery powtórzeń dinukleotydów (Luchini, 2019).

1.7 Zasada badania

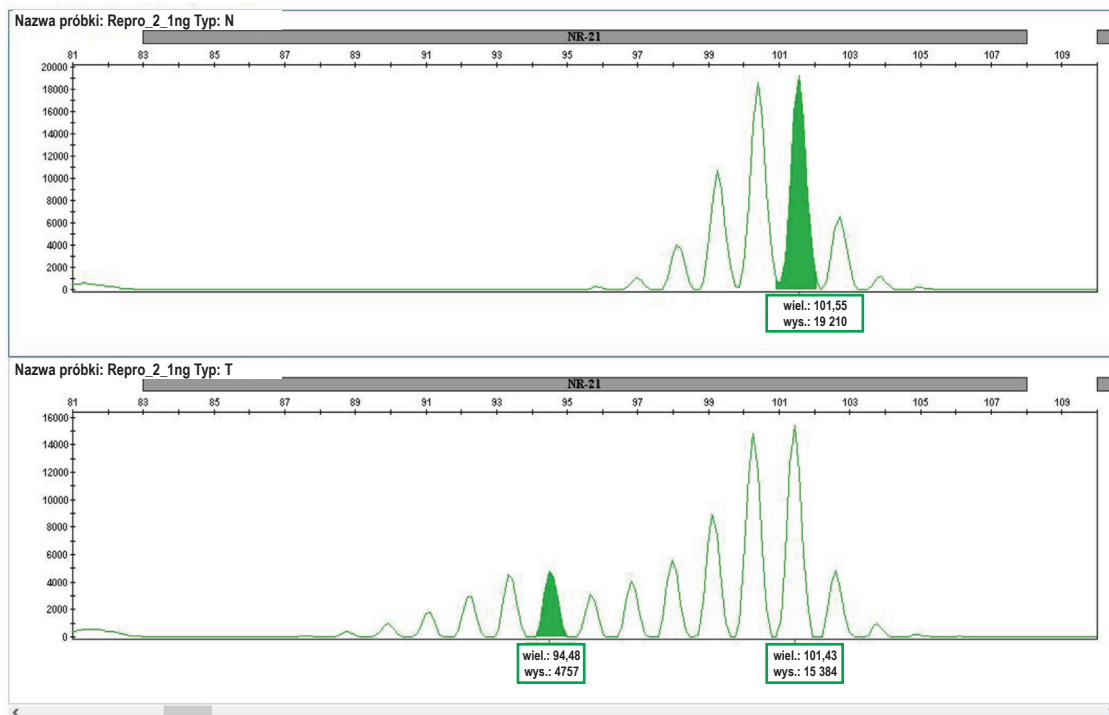
System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System to oparty na multipleksie PCR test fluorescencyjny służący do wykrywania różnic w długości sekwencji DNA w mikrosatelitarnych regionach DNA komórki nowotworowej względem tych samych regionów w zdrowych komórkach pacjenta. System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System jest ukierunkowany na siedem markerów mikrosatelitarnych: pięć markerów powtórzeń mononukleotydów (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 i MONO-27) i dwa markery powtórzeń pentanukleotydów (Penta C i Penta D; tabela 1, rysunek 2). Wymienione markery powtórzeń mononukleotydów analizuje się w celu określenia statusu MSI, a wybrano je z uwagi na wysoką czułość i specyficzność względem zmian w długości powtórzeń w próbkach z niezgodnością deficytu naprawczego. W przypadku każdego z pięciu markerów powtórzeń mononukleotydów porównuje się wielkości alleli (wyrażane jako liczba par zasad) w próbce tkanki guza i próbce zdrowej tkanki, aby wykryć ewentualną obecność nowego allelu wskazującego na MSI (rysunek 3). Marker jest interpretowany jako niestabilny, gdy zostaje wykryty nowy allel, w przypadku którego różnica wielkości w porównaniu do allelu wzorcowego w próbce zdrowej tkanki wynosi co najmniej 2,75 bp (3 zasady minus 0,25 pary zasad, aby uwzględnić precyzję wymiarowania metodą elektroforezy kapilarnej). Próbka guza jest uznawana za MSI-H, gdy co najmniej dwa markery zostają zinterpretowane jako niestabilne. Próbkę guza uznaje się za MSS, gdy mniej niż dwa markery zostają zinterpretowane jako niestabilne (Hampel, 2008; Boland, 1998). Choć takie markery są quasi-monomorficzne (tj. takie, w przypadku których większość osobników jest homozygotyczna pod względem tych samych powszechnie występujących alleli), a zdrowa tkanka zwykle wykazuje jednakowy rozkład pików dla poszczególnych markerów mononukleotydowych, zaobserwowano rzadko występującą heterozygotyczność, czyli różną długość alleli w zdrowej tkance u różnych osobników. Z uwagi na możliwą heterozygotyczność dane dotyczące próbek tkanek guza CRC i odpowiadających im próbek zdrowych tkanek muszą być interpretowane łącznie, aby można było określić status MSI guza. Dwa markery powtórzeń pentanukleotydów analizuje się w celu potwierdzenia tożsamości próbki DNA ze zdrowej tkanki i próbki DNA guza, a wybrano je z uwagi na wysoki poziom polimorfizmu i niższy stopień MSI (Bacher, 2004). Gdy wszystkie allele wykryte w próbce zdrowej tkanki są obecne również w próbce guza, tożsamość próbek (tj. fakt, że pochodzą od jednego pacjenta) zostaje potwierdzona.

Tabela 1. Oczekiwane zakresy wielkości produktów amplifikacji oraz kanały detekcji dla markerów wchodzących w skład zestawu do amplifikacji sytemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.
Zakresy odpowiadają wielkościom oczekiwanym w odniesieniu do danych generowanych przy użyciu polimeru POP-7® Polymer i zestawu kapilar 50 cm.

Markery mononukleotydowe	Struktura powtórzenia	Kanał detekcji	Zakres wielkości produktów amplifikacji
BAT-26	A ₍₂₆₎	Niebieski	od 83 do 121 bp
NR-21	A ₍₂₁₎	Zielony	od 83 do 108 bp
BAT-25	A ₍₂₅₎	Zielony	od 110 do 132 bp
MONO-27	A ₍₂₇₎	Zielony	od 134 do 168 bp
NR-24	A ₍₂₄₎	Żółty (wyświetlany jako czarny)	od 103 do 138 bp
Markery pentanukleotydowe	Struktura powtórzenia	Kanał detekcji	Zakres wielkości produktów amplifikacji
Penta D	AAAGA ₍₂₋₁₇₎	Niebieski	od 123 do 253 bp
Penta C	AAAAC ₍₄₋₁₇₎	Żółty (wyświetlany jako czarny)	od 140 do 228 bp



Rysunek 2. Przykład danych z systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Pojedynczą matrycę genomowego DNA (1 ng) zamplifikowano przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System, a produkty reakcji PCR przeanalizowano przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer z polimerem POP-7® Polymer i zestawem kapilar 50 cm. **Panel A.** Elektroferogram przedstawiający jednoczesną detekcję wszystkich znakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA. **Panel B–E.** Dane mikrosatelitarne wyświetlane według kanału detekcji dla łatwiejszej interpretacji. Panel E przedstawia piki dla fragmentów standardu wielkości Size Standard 500.



16114TA

Rysunek 3. Ocena stabilności markerów mononukleotydowych. W powyższym przykładzie zaznaczono allele mikrosatelitarne będące przedmiotem zainteresowania. W przypadku markera mononukleotydowego, jeśli różnica wielkości między nowym allelem w próbce tkanki guza a allelem wzorcowym w próbce zdrowej tkanki wynosi co najmniej 2,75 bp, marker jest interpretowany jako niestabilny. W tym przykładzie allel wzorcowy w próbce zdrowej tkanki (górny elektroferogram) ma długość 101,55 bp, a nowy allel w próbce tkanki guza (dolny elektroferogram) ma długość 94,48 bp. Różnica wielkości między tymi dwoma allelami wynosi 7,07 bp; ta różnica jest $\geq 2,75$ bp, a zatem marker NR-21 jest interpretowany jako niestabilny.

Każdy z siedmiu regionów mikrosatelitarnych jest amplifikowany w ramach tej samej reakcji z wykorzystaniem multiplexu PCR ze starterami znakowanymi barwnikiem fluorescencyjnym, aby uzyskać znakowane barwnikiem produkty reakcji PCR. Następnie produkty reakcji PCR oraz znakowany fluorescencyjnie standard wielkości Size Standard 500 są dodawane do formamidu i denaturowane metodą termiczną. Uzyskiwany łańcuch jednoniciowy DNA jest wstrzykiwany elektrokinetycznie do aparatu do elektroforezy kapilarnej, gdzie fragmenty DNA są rozdzielane w zależności od wielkości i wykrywane przy użyciu załączonego znacznika fluorescencyjnego. Analiza standardu wielkości wraz z mikrosatelitarnymi fragmentami DNA umożliwia dokładne wymiarowanie i bezpośrednie porównanie wielkości fragmentów pochodzących z różnych próbek. Po przeprowadzeniu elektroforezy kapilarnej pliki z danymi na temat fragmentów DNA (w formacie .fsa) wygenerowane przez aparat można przeanalizować przy użyciu oprogramowania do analizy fragmentów DNA, aby określić wielkość fragmentów i zidentyfikować allele.

2. Składniki produktu i warunki przechowywania

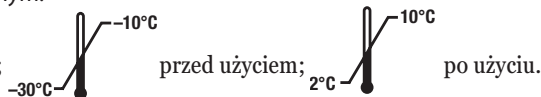
2.1 Materiały dostarczane w zestawie z systemem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System (nr kat. MD3140)

 Niniejszy produkt zawiera odczynniki w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 100 reakcji (50 reakcji sparowanych).
Produkt zawiera następujące materiały:

ELEMENT	ROZMIAR	NR ARTYKUŁU
Mieszanka starterów OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	200 µl	MD705A

Zawartość zestawu: Znakowane i nieznakowane fluoroforem startery dla markerów BAT-26, Penta D, NR-21, BAT-25, MONO-27, NR-24 i Penta C w roztworze buforowanym.

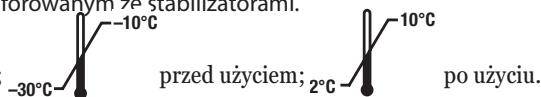
 **Warunki przechowywania:** Obszar przedamplifikacyjny; Chronić przed światłem.



ELEMENT	ROZMIAR	NR ARTYKUŁU
Mieszanka podstawowa OncoMate™ MSI 5X Master Mix	200 µl	MD280A

Zawartość zestawu: Polimeraza DNA GoTaq® MDx Hot Start DNA Polymerase, trifosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP), chlorek magnezu i sole w roztworze buforowanym ze stabilizatorami.

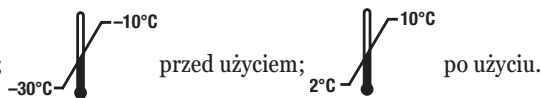
Warunki przechowywania: Obszar przedamplifikacyjny;



ELEMENT	ROZMIAR	NR ARTYKUŁU
Kontrolny DNA 2800M Control DNA, 10 ng/µl	25 µl	MD810A

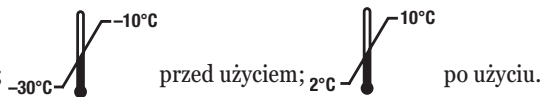
Zawartość zestawu: Wzorec męskiego genowego DNA uzyskanego z linii komórkowej w roztworze buforowanym.

Warunki przechowywania: Obszar przedamplifikacyjny;



ELEMENT	ROZMIAR	NR ARTYKUŁU
Water, Amplification Grade	1,25 ml	MD193A

Warunki przechowywania: Obszar przedamplifikacyjny;

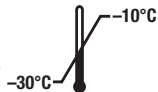


ELEMENT	ROZMIAR	NR ARTYKUŁU
Standard wielkości Size Standard 500	100 µl	MD500A

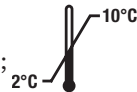
Zawartość zestawu: Znakowane fluoroforem fragmenty DNA w roztworze buforowanym.



Warunki przechowywania: Obszar poamplifikacyjny; użyciu. Chronić przed światłem.



przed użyciem;



po pierwszym

2.2 Przechowywanie systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System i obchodzenie się z nim

Po odbiorze wszystkie elementy należy przechowywać w temperaturze od -30°C do -10°C w zamrażarce niebezzronowej. Kontrolny DNA 2800M Control DNA przed pierwszym użyciem należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 10°C przez co najmniej 8 godzin. System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System po pierwszym użyciu należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 10°C nie dłużej niż 3 miesiące. Mieszanina starterów OncoMate™ MSI 5X Primer Mix i standard wielkości Size Standard 500 są światłoczułe i muszą być przechowywane w ciemności. Nie należy ich ponownie zamrażać. Odczynniki przedamplifikacyjne i poamplifikacyjne należy przechowywać w oddzielnych pomieszczeniach i używać do nich osobnych pipet, statywów na próbki itp. Przechowywanie elementów w warunkach innych niż określone na etykietach może skutkować ich niewłaściwym działaniem i wypłynąć negatywnie na uzyskiwane wyniki.

2.3 Materiały niedostarczane

Odczynniki laboratoryjne

- System do ekstrakcji DNA (patrz części 3.3 i 3.4)
- Standard matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard (nr kat. firmy Promega: MD3850)
- Hi-Di™ Formamide (nr kat. firmy Applied Biosystems: 4404307)
- Odczynniki do oznaczania ilościowego dsDNA przy użyciu barwników fluorescencyjnych (patrz część 3.4)
- Woda wolna od nukleaz (nr kat. firmy Promega: MC1191)

Uwaga: Bardzo ważne jest, aby używać wysokiej jakości Hi-Di™ Formamide. Hi-Di™ Formamide należy zamrażać w porcjach, w temperaturze od -30°C do -10°C. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie bądź dłuższe przechowywanie w temperaturze od 2 do 10°C może doprowadzić do rozkładu formamidu. Formamid niskiej jakości może zawierać jony konkurujące z DNA przy iniekcji, co prowadzi do obniżenia wysokości pików i zmniejszenia czułości.

Materiały laboratoryjne

Uwaga: Następujący sprzęt laboratoryjny musi być dostępny w dwóch odrębnych częściach laboratorium, przeznaczonych do przeprowadzania odpowiednio procedur przedamplifikacyjnych i poamplifikacyjnych:

- zestaw kalibrowanych pipet precyzyjnych do objętości w zakresie od 1 µl do 1000 µl,
- końcówki pipet odporne na aerozole (od 10 µl do 1000 µl),
- próbki mikrowirówkowe 1,5 ml,
- optyczna mikropłytk reakcyjna 96-dołkowa z kodem kreskowym MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (nr kat. firmy Thermo Fisher Scientific: 4306737),
- zestaw przezroczystych wieczek do płytek MicroAmp® 8-Cap Strip (nr kat. firmy Thermo Fisher Scientific: N8010535) (wyłącznie do procedur przedamplifikacyjnych),

- osobista mikrowirówka (miniwirówka),
- wirówka kompatybilna z mikroplytkami 96-dołkowymi (np. wirówka miniptytkowa),
- statywy na probówki mikrowirówkowe,
- wytrząsarka,
- zamrażarka niebezsronowa zapewniająca zakres temperatur od -30°C do -10°C,
- chłodziarka zapewniająca zakres temperatur od 2°C do 10°C,
- kruszony lód (wyłącznie do procedur poamplifikacyjnych),
- sprzęt do ekstrakcji DNA (np. bloki grzejne, wirówki) w oparciu o wybraną metodę (wyłącznie do procedur przedamplifikacyjnych)

Aparatura i akcesoria

- aparat do ekstrakcji DNA, jeśli wybrano metodę zautomatyzowaną
- aparat do oznaczania ilościowego DNA wraz z odpowiednimi materiałami eksploatacyjnymi
- aparat do elektroforezy kapilarnej wraz z odpowiednimi materiałami eksploatacyjnymi
- termocykler do mikroplytek 96-dołkowych

Oprogramowanie

- Oprogramowanie do analizy fragmentów (tj. oprogramowanie umożliwiające analizę plików w formacie .fsa wygenerowanych przez aparat do elektroforezy kapilarnej)

3. Przed rozpoczęciem

3.1 Ostrzeżenia i środki ostrożności



Ostrzeżenie przed zagrożeniem ze strony substancji chemicznych: Niektóre odczynniki wykorzystywane podczas analizy fragmentów to substancje potencjalnie niebezpieczne. Podczas obchodzenia się z materiałami niebezpiecznymi oraz ich utylizacji należy przestrzegać wytycznych obowiązujących w placówce. Formamid działa drażniąco i teratogennie; należy unikać wdychania i kontaktu tej substancji ze skórą. Należy przeczytać etykietę ostrzegawczą i podczas pracy z tą substancją stosować odpowiednie środki ostrożności. Podczas pracy z formamidem należy zawsze nosić rękawiczki i okulary ochronne. Przed użyciem formamidu należy zapoznać się z kartą charakterystyki produktu dostarczoną przez producenta.

Oświadczenie dotyczące karty charakterystyki produktu: Ważne informacje dotyczące bezpiecznego transportu i utylizacji niniejszego produktu oraz obchodzenia się z nim zamieszczono w karcie charakterystyki produktu (Safety Data Sheet — SDS). Karty SDS wszystkich odczynników, które wchodzi w skład zestawu, są dostępne na stronie internetowej pod adresem: www.promega.com/resources/msds/ lub na żądanie przesłane do działu pomocy technicznej firmy Promega na adres: genetic@promega.com

Środki ostrożności dotyczące bezpieczeństwa biologicznego: System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System jest przeznaczony do stosowania z próbkami tkanek utrwalonymi w parafinie. Podczas obchodzenia się z takimi tkankami oraz ich utylizacji należy przestrzegać wytycznych obowiązujących w placówce.

Środki ostrożności dotyczące reakcji PCR: Jakość oczyszczonego DNA, niewielkie zmiany w buforach, siła jonowa, stężenia starterów, objętość reakcji, dobór termocyklera oraz warunki cykli termicznych mogą mieć wpływ na prawidłowy przebieg reakcji PCR. Dlatego, używając systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System, należy ściśle przestrzegać zalecanych procedur amplifikacji i wykrywania fluorescencji opisanych w niniejszym podręczniku.

Minimalizowanie zanieczyszczenia: Analiza mikrosatelitarna w oparciu o reakcję PCR jest podatna na zanieczyszczenie bardzo małymi ilościami ludzkiego DNA. Podczas przygotowywania matrycowego DNA, obchodzenia się z elementami zestawu, przygotowywania reakcji amplifikacji i analizowania produktów amplifikacji należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego. Odczynniki i materiały do zastosowania przed amplifikacją (mieszanina podstawowa OncoMate™ MSI 5X Master Mix, mieszanina starterów OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, kontrolny DNA 2800M Control DNA i woda do amplifikacji) i po amplifikacji (standard wielkości Size Standard 500) muszą być przechowywane i używane w oddzielnych pomieszczeniach. Reakcje amplifikacji należy przygotowywać w pomieszczeniu przeznaczonym do konfiguracji reakcji. Należy używać aparatury i materiałów przeznaczonych do konfiguracji amplifikacji. Należy zawsze uwzględniać reakcję kontroli ujemnej (tj. bez matrycy) służącą do wykrywania zanieczyszczenia odczynników oraz reakcję kontroli dodatniej służącą do weryfikacji poprawności działania odczynników. Aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu, należy nosić rękawiczki i używać pipet z końcówkami odpornymi na aerozole.

3.2 Wymogi dotyczące próbek

Wycinki tkanek odpowiednie do oznaczania przygotowuje się przy użyciu 10% obojętnie buforowanego roztworu formaliny zgodnie ze standardowymi praktykami stosowanymi w patologii. Zawierają one wystarczającą liczbę komórek jądrzastych, a analiza patologiczna wykazuje zawartość komórek nowotworowych $\geq 20\%$. Ocenę wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przeprowadzono na podstawie DNA wyekstrahowanego przy użyciu aparatu Maxwell® CSC Instrument oraz zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit z utrwalonych w parafinie próbek tkanek raka jelita grubego spełniających powyższe kryteria.

3.3 Metody ekstrakcji DNA i wymogi dotyczące jakości DNA

Uzyskanie DNA o wystarczająco wysokiej jakości z tkanek utrwalonych w parafinie (FFPE) może być trudne. DNA może ulec degradacji z powodu długotrwałego lub nieodpowiedniego utrwalenia próbki tkanki przed osadzeniem w parafinie, a podczas ekstrakcji może dojść do zanieczyszczenia inhibitorami amplifikacji pochodzącymi z próbki FFPE lub zastosowanej metody ekstrakcji. Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności wybranej metody oczyszczania DNA z niniejszym oznaczeniem. Obecność inhibitorów amplifikacji w oczyszczonych ekstraktach DNA można wykryć przy użyciu kontroli oznaczeń PCR.

Wiarygodność systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System oceniono na podstawie DNA wyekstrahowanego z utrwalonych w parafinie próbek tkanek raka jelita grubego przy użyciu zestawu Maxwell® CSC DNA FFPE Kit (nr kat. AS1350) w połączeniu z aparatem Maxwell® CSC Instrument (nr kat. AS6000). Wykazano, że obecność maksymalnie 5% etanolu lub maksymalnie 50 μM chlorowodoru guanidyny w wyekstrahowanym DNA nie ma wpływu na wiarygodność systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.4 Wymogi dotyczące ilości DNA

Zestaw do amplifikacji systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System jest przeznaczony do stosowania z 1 ng DNA. DNA przed użyciem musi zostać oznaczony ilościowo. Pomiar absorbancji promieniowania UV nie jest wiarygodną metodą oznaczenia ilościowego oczyszczonego dsDNA wyekstrahowanego z próbek tkanek FFPE. Do oszacowania stężenia DNA zaleca się użyć barwników fluorescencyjnych wiążących dsDNA lub ilościowej metody PCR. Obie metody pozwalają na bardziej wiarygodne oznaczenie ilościowe oczyszczonego DNA wyekstrahowanego z próbek tkanek FFPE, zwłaszcza gdy stężenia DNA są niskie, lub gdy eluaty DNA zawierają powszechnie występujące zanieczyszczenia (np. RNA, wolne nukleotydy, rozpuszczalniki, detergenty, białka lub sole).

Ocenę działania systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przeprowadzono z wykorzystaniem próbek DNA CRC oznaczonych ilościowo przy użyciu barwników wiążących dsDNA, umożliwiających dokładny pomiar stężeń dsDNA, nawet tak niskich jak 0,05 ng/μl. W trakcie oceny wiarygodności DNA oznaczono ilościowo przy użyciu systemu QuantiFluor® dsDNA System (nr kat. E2670) przeznaczonego do ogólnego użytku laboratoryjnego.

3.5 Wymogi dotyczące termocyklera

Wiarygodność systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System oceniono przy użyciu termocyklerów Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® i Bio-Rad C1000 Touch™ o następujących minimalnych parametrach technicznych:

Maksymalna szybkość zmiany temperatury bloków: od 3,9°C/sekundę do 5°C/sekundę

Dokładność temperatury: $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ (przy $\geq 90^{\circ}\text{C}$)

Jednorodność rozkładu temperatury: $< 0,5^{\circ}\text{C}$ (przy $\geq 90^{\circ}\text{C}$)

Ogrzewana pokrywa umożliwiająca osiągnięcie temperatury w zakresie od 103°C do 105°C

Użycie termocyklerów, których parametry techniczne wykraczają poza podane zakresy, może mieć negatywny wpływ na wiarygodność oznaczenia.

3.6 Wymogi dotyczące aparatu do elektroforezy kapilarnej

Produkty amplifikacji uzyskane przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System są rozdzielane według długości (wielkości) fragmentów metodą elektroforezy kapilarnej. Z wyjątkiem wyboru zestawu barwników do kalibracji spektralnej w oparciu o metodę AnyDye (Dowolny barwnik), zastosowano domyślną opcję Fragment Analysis (Analiza fragmentów) dostępną w oprogramowaniu do gromadzenia danych, a czas iniekcji zróżnicowano tak, aby uzyskać odpowiednie wysokości pików fragmentów. W przypadku kontrolnego DNA 2800M Control DNA docelowa wysokość pików dla siedmiu markerów systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wynosiła około 8000 względnych jednostek fluorescencji (RFU). Wiarygodność systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System oceniono przy pomocy analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer skonfigurowanego do użycia z polimerem POP-7® Polymer i zestawem kapilar 50 cm. Warunki robocze podczas oceny wiarygodności urządzenia wymieniono w załączniku B (w części 11.2). Aparaty do elektroforezy kapilarnej kompatybilne z systemem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System charakteryzują się następującymi parametrami:

Liczba wykrywanych barwników: ≥ 5

Długość zestawu kapilar: długości zestawów odpowiednie do uzyskania rozdzielczości równej jednej parze zasad, w tym 50 cm

Matryca separacyjna: POP-7® lub odpowiednik

Długość fali wzbudzenia (przybliżona): 480 nm do 520 nm

Elementy optyczne do wykrywania: Barwniki Promega wymagają przechwytywania emisji o długości fali od ok. 500 nm do 630 nm

Zakres rozdzielczości: Rozdzielczość 1 bp od 60 bp do ≥ 300 bp

Precyzja wymiarowania (powtarzalność, wyrażona jako odchylenie standardowe): $\leq 0,15$ bp w zakresie od 60 bp do ≥ 300 bp

Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej oraz wybranej metody analizy z produktami zamplifikowanymi przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.7 Wymogi dotyczące kalibracji spektralnej aparatu do elektroforezy kapilarnej

Przed pierwszym użyciem należy przeprowadzić kalibrację spektralną aparatu do elektroforezy kapilarnej przy użyciu standardu matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard (nr kat. MD3850). Kalibrację spektralną przeprowadza się zgodnie z instrukcją techniczną *standardu matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard* nr TM597 i instrukcją obsługi aparatu do elektroforezy kapilarnej. Ta procedura dostarcza danych, których aparat do elektroforezy kapilarnej potrzebuje do przeprowadzenia analizy nakładających się na siebie sygnałów fluorescencyjnych pochodzących z kilku znakowanych barwnikiem fragmentów DNA zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Ustawienia kalibracji zastosowane podczas oceny wiarygodności urządzenia wymieniono w załączniku A (w części 11.1). Nową kalibrację spektralną należy przeprowadzać zgodnie z zaleceniami producenta aparatu do elektroforezy kapilarnej. Na przykład nowa kalibracja spektralna jest wymagana po wykonaniu każdej istotnej czynności związanej z konserwacją systemu do elektroforezy kapilarnej, takiej jak wymiana źródła wzbudzenia (np. lasera), kalibracja lub wymiana elementów optycznych albo zmiana rodzaju polimeru lub zestawu kapilar.

3.8 Wymogi dotyczące oprogramowania do analizy danych

Do przeprowadzenia analizy danych z elektroforezy kapilarnej fragmentów zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wymagane jest odpowiednie oprogramowanie. Takie oprogramowanie odbierze pliki z danymi fragmentów (w formacie .fsa), obliczy wielkości fragmentów metodą hybrydyzacji miejscowej typu Southern blot, przypisze fragmenty do markerów według zakresu wielkości i znacznika fluorescencyjnego (tj. koloru barwnika), zestaw i wyświetli w tabeli dane dotyczące mieszaniny fragmentów o różnej wielkości (od ≥ 65 bp do 300 bp) i barwników (≥ 5), a na koniec wydrukuje i eksportuje przeanalizowane dane według markerów i obliczonych wielkości alleli. Odpowiednie oprogramowanie wyświetli również informacje dotyczące jakości danych (np. piki wykraczające poza skalę) zarejestrowane w trakcie elektroforezy kapilarnej i obliczy podstawowe parametry QC (np. wykryje szerokie piki) w oparciu o ustawienia użytkownika.

Dane wygenerowane podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przeanalizowano przy użyciu oprogramowania GeneMapper® Software w wersji 5.0, a ustawienia metody analizy wymieniono w załączniku C (część 11.3).

3.9 Wymogi dotyczące wartości progowej analizy

Przed przystąpieniem do analizy danych użytkownik musi określić wartość progową analizy (tj. próg wykrywalności) oznaczenia. Wartość progowa analizy to wartość RFU, powyżej której sygnały próbki można odróżnić od szumu generowanego przez aparaturę, co ułatwia użytkownikowi poprawną analizę danych dotyczących fragmentów. Ustalenie wartości progowej analizy jest kluczowe dla zapewnienia odpowiedniej jakości danych pacjenta (patrz część 7.5). Opisy odpowiednich procedur określania wartości progowej analizy można znaleźć w literaturze technicznej (np. Bregu, 2013). Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer zastosowana wartość progowa analizy wynosiła 175 RFU dla wszystkich kanałów barwników, przy czym wartość tę określono metodą górnej granicy, tj. w oparciu o regresję liniową intensywności pików wygenerowanych z próbek zawierających różne wejściowe ilości DNA (Bregu, 2013).

4. Protokół oznaczenia

Odczynniki przedamplifikacyjne i poamplifikacyjne należy przechowywać w oddzielnych pomieszczeniach. Rozcieńczenia matrycowego DNA i reakcje amplifikacji należy przygotowywać w pomieszczeniu przeznaczonym do konfiguracji reakcji. Należy używać aparatury i materiałów przeznaczonych do konfiguracji amplifikacji. Aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu DNA, należy nosić rękawiczki i używać pipet z końcówkami odpornymi na aerozole. Dodając poszczególne próbki DNA, kontrolny DNA 2800M Control DNA i wodę do amplifikacji (w przypadku kontroli ujemnych) do reakcji amplifikacji, należy za każdym razem użyć świeżej końcówki pipety.

4.1 Rozcieńczanie DNA wyekstrahowanego z tkanek FFPE

W przypadku systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wymagana wejściowa ilość dsDNA, dodawanego w objętości od 1 µl do 6 µl, wynosi 1,0 ng na reakcję. Zaleca się rozcieńczenie DNA do uzyskania stałego stężenia we wszystkich próbkach, tak aby umożliwić dodanie do każdej reakcji 1 ng DNA w stałej objętości. Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wszystkie matryce DNA rozcieńczono do uzyskania stężenia 0,5 ng/µl, a następnie do każdej reakcji dodano 2 µl rozcieńczonego matrycowego DNA.

W przypadku próbek DNA, które wymagają rozcieńczenia przed amplifikacją, należy wykonać następujące czynności:

1. Mieszać próbkę DNA w wytrząsarce trzykrotnie po 5 sekund, za każdym razem z maksymalną prędkością, a w razie potrzeby odwirować krótko (1–2 sekundy) w miniwirówce, aby zebrać próbkę na dnie probówki.
Uwaga: Nieodpowiednie zmieszanie próbek DNA i ich rozcieńczeń może skutkować błędnym oznaczeniem ilościowym i niską wiarygodnością systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.
2. Rozcieńczyć próbkę DNA w wodzie wolnej od nukleaz (nr kat. MC1191) do uzyskania odpowiedniego stężenia, tak aby umożliwić dodanie do każdej reakcji amplifikacji 1,0 ng dsDNA w wymaganej objętości matrycy (patrz część 4.3). Podczas rozcieńczania próbki DNA odmierzyć za pomocą pipety objętości ≥ 1 µl, aby zapewnić jak największą dokładność.

Uwaga: Jeśli wymagane jest rozcieńczenie próbki, należy użyć wody wolnej od nukleaz. Na wydajność amplifikacji metodą PCR znaczny wpływ mogą mieć zmiany odczynu pH (wskutek dodania Tris-HCl) lub zmiany stężenia dostępnego magnezu (wskutek chelatowania przez EDTA) w reakcji amplifikacji w przypadku użycia rozcieńczalników na bazie Tris lub Tris-EDTA. Nieodpowiednie zmieszanie próbek DNA i ich rozcieńczeń może skutkować błędnym oznaczeniem ilościowym i niską wiarygodnością systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże rozcieńczenia próbek DNA. Przechowywanie próbek rozcieńczonego DNA do późniejszego użytku może skutkować słabą amplifikacją i niepowodzeniem oznaczenia.

4.2 Rozcieńczanie kontrolnego DNA 2800M Control DNA

Kontrolny DNA 2800M Control DNA służy za kontrolę dodatnią amplifikacji (patrz część 7.3), a nie kontrolę MSI. System do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System jest przeznaczony do użycia z kontrolnym DNA 2800M Control DNA w ilości wejściowej 1,0 ng, dostarczanej w objętości od 1,0 µl do 6,0 µl. Kontrolny DNA 2800M Control DNA w stężeniu 10 ng/µl przed użyciem należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 10°C przez co najmniej 8 godzin. Zaleca się rozcieńczenie kontrolnego DNA tak, aby jego stężenie było równe stężeniu badanych próbek. Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System kontrolny DNA 2800M Control DNA rozcieńczono do uzyskania stężenia 0,5 ng/µl, a następnie do każdej reakcji dodano 2 µl rozcieńczonego kontrolnego DNA.

1. Mieszać kontrolny DNA 2800M Control DNA w wyrzäsarce trzykrotnie po 10 sekund, za każdym razem z maksymalną prędkością.
2. Rozcieńczyć kontrolny DNA 2800M Control DNA w wodzie wolnej od nukleaz (nr kat. MC1191) lub wodzie do amplifikacji tak, aby umożliwić dodanie do reakcji kontroli dodatniej 1,0 ng w wymaganej objętości (1–6 µl). Przykładowe stężenia przedstawiono w tabeli 2. Podczas przygotowywania rozcieńczeń kontrolnego DNA 2800M Control DNA odmierzyć za pomocą pipety objętości ≥ 1 µl, aby zapewnić jak największą dokładność.

Tabela 2. Rozcieńczanie kontrolnego DNA 2800M Control DNA.

Objętość matrycy DNA na reakcję	Objętość kontrolnego DNA 2800M Control DNA (10 ng/µl)	Objętość wody 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

¹Woda wolna od nukleaz lub woda do amplifikacji



Uwaga: Do każdego doświadczenia należy przygotować świeże rozcieńczenie kontrolnego DNA 2800M Control DNA. Przechowywanie rozcieńczonego kontrolnego DNA 2800M Control DNA do późniejszego użytku może skutkować słabą amplifikacją kontroli dodatniej i niepowodzeniem oznaczenia.

4.3 Przygotowywanie reakcji amplifikacji przeprowadzanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1. Przed pierwszym użyciem całkowicie rozmrozić mieszaninę starterów OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, mieszaninę podstawową OncoMate™ MSI 5X Master Mix i wodę do amplifikacji. Po pierwszym użyciu przechowywać odczynniki w temperaturze od 2°C do 10°C nie dłużej niż 3 miesiące.
2. Próbówki odwirować krótko (1–2 sekundy) w miniwirówce, aby zawartość opadła na dno, a następnie mieszać odczynniki w wytrząsarce trzykrotnie po 3 sekundy, za każdym razem z maksymalną prędkością. Nie odwirowywać po mieszanii w wytrząsarce, ponieważ może to doprowadzić do powstania gradientu stężeń w próbówce.
3. Oznaczyć nową optyczną mikroplótkę reakcyjną 96-dołkową z kodem kreskowym MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode.
4. Określić liczbę reakcji do przygotowania. Należy przy tym uwzględnić co najmniej jedną reakcję kontroli dodatniej i jedną reakcję kontroli ujemnej amplifikacji na każdą przetwarzaną mikroplótkę. Dodać dodatkowe reakcje, aby skompensować błąd pipetowania. Choć takie rozwiązanie wymaga zużycia niewielkich ilości poszczególnych odczynników, zapewnia ilość mieszaniny wystarczającą do amplifikacji wszystkich próbek metodą PCR.
5. Przygotować mieszaninę do amplifikacji metodą PCR w sposób opisany w tabeli 3. Dodać końcową objętość wody do amplifikacji, mieszaninę podstawową OncoMate™ 5X Master Mix i mieszaninę starterów OncoMate™ 5X Primer Mix do czystej próbówki o pojemności 1,5 ml. Matrycowy DNA zostanie dodany do każdego dołka reakcyjnego osobno w kroku 7.

Uwaga: W tabeli 3 przyjmuje się, że objętość matrycowego DNA dodawanego do reakcji w kroku 7 jest stała we wszystkich próbkach.

Tabela 3. Skład mieszaniny do amplifikacji metodą PCR.

Składnik mieszaniny do amplifikacji metodą PCR ¹	Objętość na reakcję	Liczba reakcji	Objętość końcowa
Woda do amplifikacji	do objętości końcowej 10 µl	×	=
Mieszanina podstawowa OncoMate™ MSI 5X Master Mix ²	2 µl	×	=
Mieszanina starterów OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	2 µl	×	=
Matryca DNA (1,0 ng)	maksymalnie 6 µl		
Łączna objętość reakcji	10 µl		

¹Połączyć wodę do amplifikacji, mieszaninę podstawową OncoMate™ 5X Master Mix i mieszaninę starterów OncoMate™ 5X Primer Mix w nowej próbówce o pojemności 1,5 ml. Matrycowy DNA zostanie dodany do każdego dołka reakcyjnego osobno w kroku 7.

²Z mieszaniny podstawowej OncoMate™ MSI 5X Master Mix może wytrącać się osad. Obecność osadu nie ma wpływu na amplifikację DNA przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

6. Mieszaninę do amplifikacji metodą PCR mieszać w wytrząsarce trzykrotnie po 3 sekundy, za każdym razem z maksymalną prędkością, a następnie odmierzyć za pomocą pipety ilość mieszaniny amplifikacyjnej odpowiadającą pojedynczej reakcji i dodać ją do każdego dołka mikroplastyki lub mikroplastyk reakcyjnych użytych na potrzeby próbek i kontroli.

Uwaga: Niewystarczające wytrząśnięcie mieszaniny do amplifikacji metodą PCR może skutkować słabą amplifikacją lub brakiem równowagi między markerami. Mieszaninę do amplifikacji metodą PCR należy dodać do dołków mikroplastyki reakcyjnej bezpośrednio po przygotowaniu. Następnie należy szybko przejść do kroków od 7 do 10, po czym należy natychmiast użyć termocyklera.

7. Każdą próbkę rozcieńczonego matrycowego DNA wyekstrahowanego z tkanki FFPE (patrz opis przygotowania w części 4.1) mieszać w wytrząsarce trzykrotnie po 5 sekund, za każdym razem z maksymalną prędkością, a następnie odwirować krótko (1–2 sekundy) w miniwirówce, aby zebrać ciecz na dnie próbówki. Za pomocą pipety odmierzyć 1,0 ng próbki do wybranego dołka mikroplastyki zawierającego mieszaninę do amplifikacji metodą PCR. Kilkakrotnie wymieszać poprzez pipetowanie.
8. Rozcieńczony kontrolny DNA 2800M Control DNA (patrz opis przygotowania w części 4.2) mieszać w wytrząsarce trzykrotnie przez 10 sekund, za każdym razem z maksymalną prędkością, i odwirować krótko (1–2 sekundy) w miniwirówce, aby zebrać ciecz na dnie próbówki. Za pomocą pipety odmierzyć 1,0 ng rozcieńczonego kontrolnego DNA 2800M Control DNA i dodać do dołka lub dołków przeznaczonych dla reakcji kontroli dodatniej. Kilkakrotnie wymieszać poprzez pipetowanie.
9. Na potrzeby kontroli ujemnej amplifikacji odmierzyć za pomocą pipety objętość wody do amplifikacji równą objętości matrycowego DNA i dodać do dołka lub dołków przeznaczonych dla reakcji kontroli ujemnej. Nie dodawać matrycowego DNA do reakcji kontroli ujemnej. Kilkakrotnie wymieszać poprzez pipetowanie.

Uwaga: Brak amplifikacji i analizy reakcji kontroli ujemnej i dodatniej może uniemożliwić jednoznaczną interpretację wyników i utrudnić rozwiązywanie problemów. Każda mikroplastyka musi zawierać reakcje kontroli dodatniej i ujemnej.

10. Przykryć dołki wieczkami z zestawu MicroAmp® 8-Cap Strips i odwirować krótko w wirówce miniplastykowej, tak aby zawartość dołków opadła na dno, co pozwoli również usunąć pęcherzyki powietrza.

4.4 Cykle termiczne

1. Upewnić się, że pokrywa została ogrzana do zaprogramowanej temperatury (103–105°C) i umieścić mikroplastykę reakcyjną w termocyklerze. Zamknąć pokrywę termocyklera.
2. Zaprogramować termocykler zgodnie z instrukcjami producenta, aby przeprowadzić procedurę według protokołu przedstawionego na rysunku 4. Upewnić się, że objętość reakcji ustawiono na 10 µl. Całkowity czas cykli, łącznie ze zmianą temperatury bloków, to około 1 godzina i 15 minut.

Protokół cykli termicznych¹

96°C przez 1 minutę, następnie:

96°C przez 10 sekund

58°C przez 1 minutę

72°C przez 30 sekund

przez 29 cykli, następnie:

60°C przez 10 minut, następnie:

utrzymywać w temperaturze 4°C

¹Objętość reakcji: 10 µl; temperatura ogrzewanej
pokrywy: od 103° do 105°C

Rysunek 4. Protokół cykli termicznych dla systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3. Po zakończeniu protokołu cykli termicznych przeprowadzić analizę fragmentów metodą elektroforezy kapilarnej lub przechowywać produkty amplifikacji przez noc w temperaturze od 2°C do 10°C lub przez dłuższy okres w temperaturze od -30°C do -10°C, chroniąc przed światłem.



Uwaga: Długotrwałe przechowywanie zamplifikowanych próbek w temperaturze wyższej niż -10°C może prowadzić do powstawania artefaktów utrudniających analizę danych.

4.5 Przygotowanie aparatu do elektroforezy kapilarnej



Wymogi dotyczące aparatu do elektroforezy kapilarnej przedstawiono w części 3.6. Należy przestrzegać instrukcji producenta w zakresie obsługi i konserwacji wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej oraz stosowania odpowiedniego polimeru i zestawów kapilar.

1. Upewnić się, że polimer i bufony używane w aparacie nie są przeterminowane, a liczba dostępnych próbek lub iniekcji jest wystarczająca do przeprowadzenia zaplanowanej analizy.
2. Jeśli dotyczy, nagrzać piec do elektroforezy kapilarnej zgodnie z instrukcjami producenta co najmniej 30 minut przed rozpoczęciem cyklu.

4.6 Przygotowanie fragmentów zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System do analizy metodą elektroforezy kapilarnej

1. Jeśli zamplifikowane próbki były przechowywane w temperaturze od -30°C do -10°C, rozmrozić je całkowicie przed rozpoczęciem procedury. Mieszać mikropłytkę w wytrząsarce przez 5 sekund i odwirować przez 5 do 10 sekund w wirówce minipłytkowej, aby zebrać zawartość na dnie dołków.
2. Określić liczbę dołków wymaganą do przeprowadzenia analizy wszystkich zamplifikowanych próbek, uwzględniając również reakcje kontroli dodatniej i ujemnej. Dodać do tej liczby wszelkie nieużywane dołki, z których będzie inicjowana iniekcja, oraz dodatkowe dołki, aby skompensować błąd pipetowania.
3. Mieszać standard wielkości Size Standard 500 w wytrząsarce trzykrotnie po 3 sekundy, za każdym razem z maksymalną prędkością, i przygotować mieszaninę do elektroforezy kapilarnej według instrukcji w tabeli 4.



Uwaga: Formamid działa drażniąco i teratogennie; należy unikać wdychania i kontaktu tej substancji ze skórą. Należy przeczytać etykietę ostrzegawczą i podczas pracy z tą substancją stosować odpowiednie środki ostrożności. Podczas pracy z formamidem należy zawsze nosić rękawiczki i okulary ochronne.

Tabela 4. Przygotowanie mieszaniny do elektroforezy kapilarnej.

Mieszanina elektroforetyczna	Objętość na dołek	×	Liczba dołków	=	Objętość końcowa
Hi-Di™ Formamide	9,5 µl	×		=	
Standard wielkości Size Standard 500	0,5 µl	×		=	
Łączna objętość	10 µl				

4. Mieszać mieszaninę elektroforetyczną w wytrząsarce trzykrotnie po 3 sekundy, za każdym razem z maksymalną prędkością, i odwirować krótko (1–2 sekundy) w miniwirówce, aby zebrać odczynniki na dnie probówki.
5. Odmierzyć za pomocą pipety 10 µl mieszaniny elektroforetycznej i dodać do każdego wymaganego dołka optycznej mikropłytki reakcyjnej 96-dołkowej MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate analizowanej przy użyciu wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej.

Uwaga: Mieszanina elektroforetyczna lub Hi-Di™ Formamide muszą zostać dodane do każdego dołka, z którego inicjowana jest iniekcja, niezależnie od tego, czy zamplifikowane produkty również dodaje się do tego dołka, czy nie. Niedodanie mieszaniny elektroforetycznej lub Hi-Di™ Formamide do dołka, z którego inicjowana jest iniekcja, może skutkować uszkodzeniem zestawu kapilar i niepowodzeniem cyklu.

6. Dodać 1 µl zamplifikowanej próbki lub reakcji kontroli do każdego wyznaczonego dołka.
7. Przykryć dołki septą zgodnie z instrukcjami producenta aparatu.
8. Odwirować mikroplótkę przez 5 do 10 sekund, tak aby mieszanina formamidu i próbki w poszczególnych dołkach opadła na dno, co pozwoli również usunąć pęcherzyki powietrza.
9. Denaturować próbki w termocyklerze przez 3 minuty w temperaturze 95°C, a następnie natychmiast schłodzić mikroplótkę reakcyjną, umieszczając ją na kruszonym lodzie na co najmniej 3 minuty. Próbki zdenaturować bezpośrednio przed załadowaniem płytki do aparatu do elektroforezy kapilarnej.
Uwaga: Nie zamykać ogrzewanej pokrywy termocyklera, ponieważ mogłoby to skutkować stopieniem septy mikroplótki.
10. Załadować mikroplótkę do aparatu do elektroforezy kapilarnej zgodnie z instrukcjami producenta. Jeśli dotyczy, przed załadowaniem upewnić się, że osiągnięto wymaganą temperaturę pieca.

4.7 Wykrywanie zamplifikowanych fragmentów metodą elektroforezy kapilarnej z detekcją fluorescencyjną

Aby dowiedzieć się, jak właściwie przeprowadzić cykl analizy fragmentów, w tym jak odpowiednio skonfigurować kalibrację spektralną i metody analizy fragmentów, a także jak dodać informacje o próbkach, załadować zdenaturowane próbki do aparatu, zainicjować cykl i wczytać dane dotyczące zakończonego cyklu, należy zapoznać się z instrukcją techniczną wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej. Programowanie aparatu należy rozpocząć od ustawienia domyślnej metody analizy fragmentów dla konkretnej konfiguracji aparatu. Aby dostosować aparat do potrzeb konkretnego laboratorium, konieczna może być optymalizacja czasu iniekcji. Użytkownik jest odpowiedzialny za sprawdzenie kompatybilności wybranych warunków elektroforezy kapilarnej z oznaczeniem. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem lub dystrybutorem firmy Promega lub wysłać wiadomość e-mail na adres genetic@promega.com.

5. Analiza danych

5.1 Wprowadzenie

Elektroforeza kapilarna produktów zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System skutkuje wygenerowaniem plików z danymi (w formacie .fsa), które wymagają dalszej analizy przy użyciu oprogramowania do analizy fragmentów (rysunek 5). Analiza danych ma na celu dostarczenie podstawowych informacji o jakości danych, zwymiarowanie pików fragmentów w zdefiniowanym zakresie wielkości, ułatwienie filtrowania tzw. pików satelitarnych spośród pików alleli rejestrowanych dla poszczególnych markerów i podsumowanie wielkości alleli każdego z tych markerów na potrzeby dalszej interpretacji wyników. Aby przeanalizować dane z elektroforezy kapilarnej przy użyciu oprogramowania do analizy fragmentów, należy wykonać następujące czynności:

Wykonać raz, przed pierwszą analizą; patrz instrukcje w załączniku C (w części 11.3):

- Określić znane wielkości dla fragmentów standardu wielkości (tj. utworzyć lub zaimportować standard wielkości oznaczenia).
- Przypisać analizowany zakres wielkości do poszczególnych markerów (tj. utworzyć lub zaimportować panele oznaczenia).
- Ustawić parametry analizy (tj. utworzyć lub zaimportować metodę analizy).
- Opcjonalnie: Zarządzać widokiem danych (tj. utworzyć lub zaimportować ustawienia tabeli, wykresu i raportu).

Wykonać dla poszczególnych partii analizowanych próbek; patrz instrukcje w części 5.2:

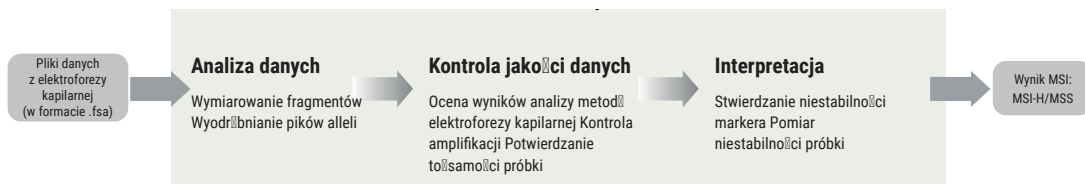
- Zaimportować pliki z danymi.
- Wybrać dane wejściowe analizy (tj. standard wielkości oznaczenia, panele oznaczenia i metodę analizy).
- Przeprowadzić analizę danych.
- Podsumować wielkości alleli poszczególnych markerów.

Do oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System użyto oprogramowania GeneMapper® Software. Ustawienia końcowej analizy danych zastosowane w trakcie oceny wiarygodności oznaczenia przedstawiono informacyjnie w załączniku C (w części 11.3). Te ustawienia zoptymalizowano tak, aby umożliwić wykrycie najmniejszych (pod względem liczby bp) odrębnych alleli poszczególnych markerów powtórzeń mononukleotydów oraz odróżnienie pików tych alleli od pików satelitarnych na potrzeby dalszej analizy. W określonych warunkach odrębne allele obecne w próbce można filtrować, stosując zalecane ustawienia analizy. Takie odfiltrowane allele nie służą do określenia stabilności markera (patrz część 6.4), ponieważ nie stanowią najmniejszych odrębnych alleli tego markera. Przykładową procedurę analizy danych dotyczących fragmentów, przeprowadzoną przy użyciu oprogramowania GeneMapper® Software, przedstawiono na rysunku 5 i opisano poniżej w części 5.2. Dodatkowe instrukcje analizy danych dotyczących fragmentów DNA przy użyciu oprogramowania GeneMapper® Software można znaleźć w *Podręczniku użytkownika dotyczącym analizy fragmentów DNA metodą elektroforezy kapilarnej*, opublikowanym przez firmę Thermo Fisher Scientific.



Uwagi:

1. Ustawienia metody analizy i paneli dla systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System określono na podstawie danych wygenerowanych przez analizator genetyczny Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer z polimerem POP-7® Polymer i zestawem kapilar 50 cm. Analiza danych uzyskanych przy zastosowaniu innych konfiguracji aparatu do elektroforezy kapilarnej może wymagać modyfikacji plików paneli i metod analizy. Aby uzyskać pomoc, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem lub dystrybutorem firmy Promega lub wysłać wiadomość e-mail na adres **genetic@promega.com**.
2. Ustawienia metody analizy przedstawione w załączniku C mogą posłużyć za wzór ułatwiający odpowiednie dobranie ustawień analizy do używanego systemu do elektroforezy kapilarnej. Jednakże wartości progowe analizy (pozycja Peak Amplitude Thresholds (Progi amplitudy pików) w zakładce Peak Detector (Detektor pików) w oknie Analysis Method Editor (Edytor metody analizy) oprogramowania GeneMapper®) muszą być określone przez konkretne laboratorium na podstawie docelowej intensywności pików próbek, zakresu dynamicznego aparatu i sygnału szumu lub tła obserwowanego w analizowanych danych (patrz część 7.5). Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wartość progowa analizy dla wszystkich kanałów barwników (B, G, Y, O) wynosiła 175 RFU. Wartości progowe analizy dla odpowiedniej aparatury do elektroforezy kapilarnej zwykle mieszczą się w zakresie od 50 RFU do 200 RFU. Prawidłowe stosowanie oraz rezultaty otrzymywane przy zastosowaniu różnych ustawień analizy objaśniono w *Podręczniku użytkownika dotyczącym analizy fragmentów DNA metodą elektroforezy kapilarnej*, opublikowanym przez firmę Thermo Fisher Scientific.



Rysunek 5. Procedura analizy danych z elektroforezy kapilarnej uzyskanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

5.2 Analiza danych

Instrukcje analizy danych przy użyciu oprogramowania GeneMapper® Software zamieszczono w niniejszym dokumencie dla wygody użytkownika. W tych instrukcjach przyjęto założenie, że użytkownik zaimportował dostępne pliki ustawień oprogramowania GeneMapper® opisane w załączniku C (część 11.3) lub utworzył podobne pliki ustawień. W przypadku korzystania z innego oprogramowania do analizy danych należy zapoznać się z informacjami i instrukcjami zawartymi w odpowiednim podręczniku użytkownika.

1. Otworzyć program GeneMapper® Software w wersji 5.0 lub 6.0.
2. Kliknąć ikonę New Project (Nowy projekt) () na pasku narzędzi i wybrać opcję **Microsatellite (Mikrosatelita)** jako typ projektu.
3. Zaimportować dane, klikając ikonę Add Samples To Project (Dodaj próbki do projektu) () na pasku narzędzi.
4. W menu rozwijanym Table Setting (Ustawienie tabeli) na pasku narzędzi wybrać pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0**.
5. Jeśli pole Sample Type (Typ próbki) nie jest wypełnione, wybrać opcję **Sample (Próbka)**, **Positive Control (Kontrola dodatnia)** lub **Negative Control (Kontrola ujemna)**, aby opisać poszczególne próbki.
6. Dla wszystkich kontroli i próbek pobranych od pacjentów wybrać pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0** jako wartość parametru Analysis Method (Metoda analizy), pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** jako wartość parametru Panel i pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** jako wartość parametru Size Standard (Standard wielkości).
7. Kliknąć ikonę Analize (Analizuj) () na pasku narzędzi, aby przeprowadzić analizę wszystkich próbek. Gdy wyświetli się monit, podać nazwę opisową projektu w oknie podręcznym Save Project (Zapisz projekt) i kliknąć przycisk **OK**.

Uwaga: Po przeprowadzeniu analizy próbki można posortować przy użyciu opcji **Sort... (Sortuj...)** dostępnej w menu **Edit (Edycja)** (np. **Sort by Sample Type (Sortuj według typu próbki)** lub **Sort by Sample Name (Sortuj według nazwy próbki)**). Zmiana kolejności próbek w taki sposób, aby poszczególne pary próbek zdrowej tkanki i tkanki guza znajdowały się obok siebie na liście, ułatwi wyświetlanie i przegląd próbek w przypadku korzystania z dostarczonego pliku Plot Settings (Ustawienia wykresu) (patrz krok 8). Przy użyciu funkcji sortowania można też upewnić się, że elektroferogramy dla poszczególnych par próbek zdrowej tkanki i tkanki guza zostaną wydrukowane na tych samych stronach (patrz krok 9c).

8. Sprawdzić jakość próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów w sposób opisany w części 6.3. Wybrać rzędy zawierające próbki kontrolne lub próbki pobrane od pacjentów i kliknąć ikonę Display Plots (Wyświetl wykresy) () na pasku narzędzi, aby wyświetlić podgląd elektroferogramów oraz tabelę z danymi alleli. W menu rozwijanym Plot Setting (Ustawienie wykresu) na pasku narzędzi wybrać pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Plot_v1.0**.

Uwaga: Kontrola elektroferogramów próbek jest konieczna dla oceny jakości danych. Zaleca się, aby najpierw sprawdzić próbki kontrolne, a następnie próbki pobrane od pacjentów. Jednoczesny wybór próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów sprawi, że okno Samples Plot (Wykres próbek) będzie stale wyświetlane i nie będzie można go zminimalizować, co ograniczy ilość wolnego miejsca na ekranie.

9. Sprawdzić prawidłowe próbki pobrane od pacjentów pod kątem statusu MSI w sposób opisany w częściach 6.4 i 6.5. Wyświetlić dane próbek w sposób opisany w kroku 8. Aby ułatwić interpretację danych wymiarowania, dane te można wyeksportować na różne sposoby, z których kilka opisano w niniejszym dokumencie.

Uwaga: Poniższe opcje eksportowania danych przedstawiono wyłącznie w celach informacyjnych.

Laboratorium przeprowadzające badanie jest odpowiedzialne za wybór najbardziej odpowiedniego formatu danych wykorzystywanych do określenia statusu MSI na dalszym etapie procedury. Aby uzyskać pomoc w opracowywaniu odpowiedniej metody raportowania dla laboratorium, należy skontaktować się z lokalnym oddziałem lub dystrybutorem firmy Promega lub wysłać wiadomość e-mail na adres **genetic@promega.com**.

- a. Plik tekstowy zawierający filtrowane wielkości alleli i inne dane dotyczące próbek można wyeksportować w postaci tabeli Genotypes Table (Tabela genotypów) w następujący sposób:
 - i. Z poziomu głównego ekranu wybrać jedną lub większą liczbę próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów i kliknąć ikonę Display Plots (Wyświetl wykresy) () na pasku narzędzi, aby otworzyć okno Samples Plot (Wykres próbek).
 - ii. Jeśli widok Genotypes Table (Tabela genotypów) nie jest wyświetlany poniżej elektroferogramu lub elektroferogramów, kliknąć ikonę Genotypes Table (Tabela genotypów) () na pasku narzędzi.
 - iii. Wybrać pozycję **Export Table (Eksportuj tabelę)** z menu **File (Plik)** i zapisać plik do dalszej analizy.
- b. Plik tekstowy zawierający filtrowane wielkości alleli i inne dane dotyczące próbek można wyeksportować jako Report (Raport) w następujący sposób:
 - i. Z poziomu głównego ekranu wybrać jedną lub większą liczbę próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów i kliknąć ikonę Report Manager (Menedżer raportów) () na pasku narzędzi, aby otworzyć okno Report Manager (Menedżer raportów).
 - ii. W menu rozwijanym Report Setting (Ustawienie raportu) na pasku narzędzi wybrać pozycję **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0**.
 - iii. Wybrać pozycję **Export... (Eksportuj...)** z menu **File (Plik)**, wprowadzić nazwę pliku i kliknąć przycisk **Export (Eksportuj)**.

Uwaga: Pola danych dostępne w przypadku eksportowania danych w postaci tabeli Genotypes Table (Tabela genotypów) różnią się od tych dostępnych w przypadku wyboru opcji Report (Raport). Istnieje możliwość dodania pól, aby spełnić konkretne wymagania laboratorium. W tym celu należy edytować pliki OncoMate™, tj. Table Settings (Ustawienia tabeli) lub Report Settings (Ustawienia raportów), w Menedżerze GeneMapper®.

- c. Podsumowanie danych w formacie dokumentu przenośnego (.pdf), zawierające elektroferogramy oraz tabelę z rozmiarami alleli, można zapisać w następujący sposób:
 - i. Z poziomu głównego ekranu wybrać jedną lub większą liczbę próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów i kliknąć ikonę Display Plots (Wyświetl wykresy) () , aby otworzyć okno Samples Plot (Wykres próbek).

- ii. Wybrać pozycję **Print... (Drukuj...)** z menu **File (Plik)**. Dla opcji Print Service (Usługa drukowania) wybrać ustawienie **Microsoft Print to PDF (Drukuj w formacie PDF firmy Microsoft)** (lub odpowiednik), a dla orientacji wybrać ustawienie **Landscape (Pozियो)**. Wybrać opcję **Print (Drukuj)** i wprowadzić nazwę dla generowanego pliku w formacie .pdf.

Uwaga: Jeśli w trakcie tego procesu generowanych jest kilka plików w formacie .pdf, muszą one mieć różne nazwy. Z tego względu laboratoria mogą preferować zapisywanie plików w formacie .pdf osobno dla każdej pary próbek.

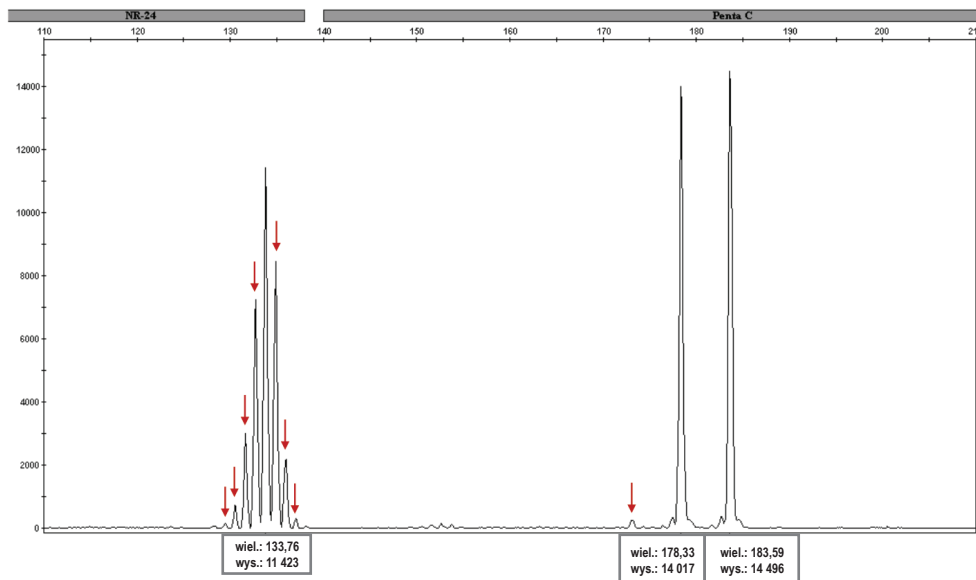
6. Przegląd i interpretacja wyników

W tej części zawarto uwagi dotyczące oceny jakości danych i interpretacji statusu MSI próbek analizowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Oprogramowanie do analizy fragmentów może oferować wiele opcji wyświetlania i przeglądu danych. Na przykład oprogramowanie GeneMapper® Software oferuje wiele różnych opcji wyświetlania i podsumowywania danych dotyczących próbek. Dodatkowe informacje na temat przeglądu danych można znaleźć w *Podręczniku użytkownika dotyczącym analizy fragmentów DNA metodą elektroforezy kapilarnej*, opublikowanym przez firmę Thermo Fisher Scientific.

6.1 Interpretacja danych wygenerowanych przez system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System

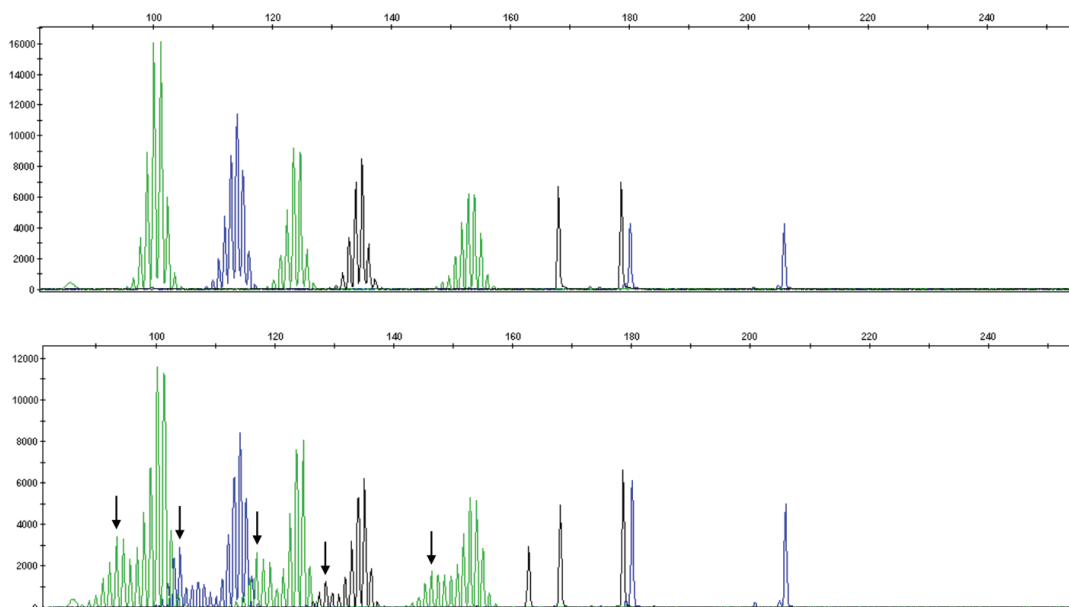
W wyniku analizy produktów reakcji PCR przeprowadzonych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System uzyskuje się dane o długości fragmentów DNA w poszczególnych amplifikowanych regionach mikrosatelitarnych. Dane dotyczące par próbek zdrowej tkanki i tkanki guza są interpretowane poprzez ocenę pięciu markerów powtórzeń mononukleotydów (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 i MONO-27) i dwóch markerów powtórzeń pentanukleotydów (Penta C i Penta D) amplifikowanych za pomocą systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Markery powtórzeń mononukleotydów analizuje się w celu ustalenia statusu MSI pacjenta. W wyniku amplifikacji markerów powtórzeń mononukleotydów metodą PCR uzyskuje się główny pik allelu oraz serię pobocznych pików satelitarnych, których rozkład ma kształt zbliżony do dzwonu, przy czym odstęp między takimi pikami wynosi 1 bp (Bacher, 2004). W każdej pojedynczej serii pików satelitarnych pik o najwyższej wartości fluorescencji (podawanej w RFU) to pik allelu (rysunek 6). Możliwe jest również zarejestrowanie więcej niż jednego piku allelu z towarzyszącymi pikami satelitarnymi dla poszczególnych markerów w próbkach zdrowej tkanki (w przypadku heterozygotyczności) lub w próbkach guza (w przypadku heterozygotyczności lub niestabilności). Oprogramowanie do analizy fragmentów, takie jak GeneMapper® Software, wykorzystuje algorytmy filtrowania pików, aby wyodrębnić piki alleli rejestrowane dla poszczególnych markerów spośród pików satelitarnych. Wielkość tych alleli jest wyświetlana na elektroferogramie i przedstawiana w formie tabeli na potrzeby dalszej interpretacji pod kątem MSI.



Rysunek 6. Piki satelitarne (zaznaczone strzałkami) generowane przez poślizg polimerazy w trakcie amplifikacji PCR krótkich powtórzeń tandemowych są wyraźnie widoczne przy markerach mononukleotydowych, w odstępach 1 bp od „prawdziwego”, czyli najwyższego, piku allelu, jak ukazuje powyższy przykład markera NR-24 (po lewej). Dużo mniejsze piki satelitarne można zauważyć również przy markerach pentanukleotydowych w odstępach 5 bp od „prawdziwych” pików alleli, jak ukazuje powyższy przykład markera Penta C.

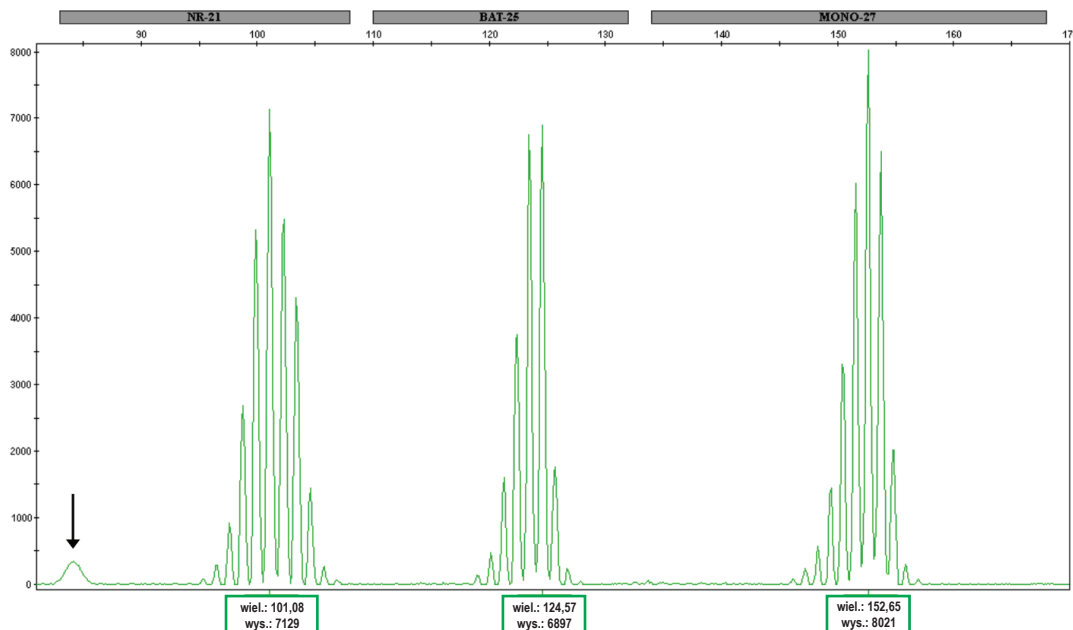
Gdy marker w próbce guza jest niestabilny, zostanie wykryty co najmniej jeden nowy allel różniący się od allelu obecnego w zdrowej tkance (rysunek 7). Różnicę w wielkości alleli wykrywa się, porównując dane próbki guza z danymi odpowiadającej jej próbki zdrowej tkanki. Próbkę guza klasyfikuje się jako MSI-H, gdy nowe allele wykryto w przypadku $\geq 40\%$ markerów powtórzeń mononukleotydów (tj. gdy ≥ 2 z 5 markerów wykazują „zmienione profile alleliczne”). Próbkę guza zawierającą mniej niż dwa zmienione markery powtórzeń mononukleotydów można sklasyfikować jako MSS (Umar, 2004; Boland, 1998).



Rysunek 7. Odpowiadające sobie próbki zdrowej tkanki (górny panel) i tkanki guza (dolny panel) przeanalizowane przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Jeden nanogram DNA zamplifikowano i przeanalizowano przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer z polimerem POP-7® Polymer i zestawem kapilar 50 cm. Obecność nowych alleli w próbce guza (zaznaczonych strzałkami), których nie wykryto we wzorcowej próbce zdrowej tkanki, wskazuje na niestabilność markerów. Przedstawiona próbka jest MSI-H, ponieważ ≥ 2 markery powtórzeń mononukleotydów wykazują niestabilność.

6.2 Podsumowanie znanych artefaktów amplifikacji oraz anomalii elektroforezy kapilarnej

Gdy do elektroforezy kapilarnej używa się polimeru POP-7® Polymer i zestawu kapilar 50 cm, w obrębie markera NR-21 odnotowuje się znany artefakt amplifikacji w postaci pojedynczego szerokiego pików, którego wielkość mieści się w zakresie od 83 bp do około 90 bp (rysunek 8). Tego pików nie należy uznawać za allel podczas określania stabilności markera NR-21. W przypadku markerów powtórzeń pentanukleotydów, tj. Penta D i Penta C, często obserwuje się obecność pików o niskiej intensywności i szerokości $n-1$ bp.



Rysunek 8. W obrębie markera NR-21 można zaobserwować artefakt amplifikacji (zaznaczony strzałką) w postaci pojedynczego szerokiego pików, którego wielkość mieści się w zakresie od 83 bp do około 90 bp. Tego pików nie należy uznawać za allel podczas określania stabilności markera NR-21.

Inne artefakty amplifikacji można zaobserwować, gdy do systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wprowadzi się zbyt dużą ilość wejściowego DNA. Wówczas linia odniesienia dla markera BAT-26 (niebieskiego kanału) może być podniesiona i postrzępiona. Z wyjątkiem bardzo dużych wejściowych ilości DNA (np. ≥ 4 ng kontrolnego DNA 2800M Control DNA), zastosowanie sugerowanych parametrów filtrowania pików do analizy przy użyciu oprogramowania GeneMapper® (patrz załącznik C) pozwoli odfiltrować te artefakty podczas identyfikacji (tj. określania wielkości) alleli markera BAT-26.

Inne znane, aczkolwiek losowe, anomalie można zaobserwować podczas elektroforezy kapilarnej. Przeważają trzy tego typu anomalie: niepowodzenie iniekcji, szerokie piki i skoki sygnału.

- a. Niepowodzenie iniekcji ma miejsce, gdy próbka DNA wstrzykiwana do zestawu kapilar jest zbyt mała lub nie zostaje wstrzyknięta w ogóle. Skutkuje to niepowodzeniem testu QC jakości wymiarowania (patrz tabela 5) z powodu braku (lub niskiej jakości) pików standardu wielkości Size Standard 500. Sizing Quality (Jakość wymiarowania) to funkcja oprogramowania GeneMapper® Software, w której wynik oblicza się na podstawie kształtu pików, dopasowania wielkości i krzywej określania wielkości. To ustawienie można znaleźć w parametrach wybranej metody analizy.
- b. Podczas elektroforezy kapilarnej może zostać wykryty pik o szerokiej (tj. nieostrej) morfologii. Szeroki pik może być spowodowany migracją kryształów lub innego nieprawidłowego materiału przez zestaw kapilar.
- c. Podczas elektroforezy kapilarnej można zaobserwować „skok” sygnału w postaci piku o niemal zerowej szerokości rejestrowanego na wszystkich kanałach barwników. Takie „skoki” są wykrywane i ignorowane przez większość programów do analizy fragmentów podczas identyfikacji alleli.

6.3 Wymogi dotyczące kontroli jakości interpretacji danych

Ocena jakości danych z systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System jest kluczowa dla prawidłowej interpretacji statusu MSI pacjenta. Należy użyć zestawu kontroli oznaczeń (kontroli dodatniej i ujemnej), aby upewnić się, że dane uzyskane za pomocą konkretnego oznaczenia i wykorzystane do interpretacji pod kątem MSI są wiarygodne (część 7). Zanim określi się status MSI próbki, przeprowadza się serię kontroli jakości danych (QC), aby stwierdzić, czy jest ona wystarczająca do uzyskania wiarygodnych wyników (tabela 5). Większość kontroli QC opisanych poniżej wymaga oceny wzrokowej elektroferogramów próbek; sama analiza tabeli z danymi alleli z określonej partii próbek nie wystarczy, aby upewnić się co do jakości danych.

Typy próbek ocenianie podczas każdej kontroli QC oraz skutki niepowodzenia kontroli QC przedstawiono w tabeli 5. Po przeprowadzeniu kontroli jakości danych status każdej próbki tkanki pobranej od pacjenta zostanie określony jako „nieprawidłowy”, co oznacza, że interpretacja pod kątem MSI jest niemożliwa z powodu krytycznego niepowodzenia kontroli QC danych, lub „prawidłowy”, co oznacza, że nie odnotowano żadnego krytycznego niepowodzenia kontroli QC, lub że pomimo nieudanej kontroli QC interpretacja statusu MSI próbki pobranej od pacjenta jest nadal możliwa na podstawie instrukcji zamieszczonych w części 6.5.3. Gdy określone testy QC próbki kontrolnej zakończą się niepowodzeniem, może to mieć negatywny wpływ na jakość wszystkich powiązanych próbek pobranych od pacjentów. Wówczas wynik „nieprawidłowy” dotyczy wszystkich próbek w partii. Gdy kontrola dodatnia i kontrola ujemna pomyślnie przejdą wszystkie testy QC, pozytywne lub negatywne wyniki testów QC danych uzyskanych z próbek pobranych od pacjentów zależą od konkretnej próbki. Status próbki pobranej od pacjenta powiązany z niepowodzeniem testu QC zależy od tego, czy nieprawidłowość zaobserwowano w przypadku kontroli dodatniej bądź kontroli ujemnej amplifikacji, czy tej konkretnej próbki. W przypadku próbek, które nie spełniły wymogów kontroli QC, można postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w niniejszym podręczniku w części „Rozwiązywanie problemów”. Zalecana kolejność kontroli jakości danych jest następująca:

1. Ocenić jakość wymiarowania wszystkich próbek kontrolnych i próbek pobranych od pacjentów.
2. Ocenić kontrolę partii (tj. dodatnią i ujemną kontrolę amplifikacji).
3. Ocenić próbki pobrane od pacjentów.

Tabela 5. Testy QC, które należy przeprowadzić przed interpretacją pod kątem MSI, aby zweryfikować jakość danych wygenerowanych przez system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

				Status próbki pobranej od pacjenta, gdy odpowiedni test QC próbki kontrolnej lub próbki pobranej od pacjenta zakończy się niepowodzeniem	
Część	Test QC	Opis testu QC	Próbki poddawane ocenie¹	Niepowodzenie testu QC próbki kontrolnej²	Niepowodzenie testu QC próbki pacjenta³
6.3.1	Test QC jakości wymiarowania	Wynik kontroli jakości oblicza się na podstawie kształtu pików, dopasowania wielkości i krzywej określania wielkości.	+, -, N, T	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbka nieprawidłowa
6.3.2	Test QC kontroli ujemnej	W przypadku kontroli ujemnej amplifikacji nie mogą zostać wykryte żadne piki, których intensywność przekraczałaby wartość progową analizy.	–	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbki pobrane od pacjentów nie podlegają ocenie.
6.3.3	Test QC tożsamości kontroli dodatniej	W przypadku dodatniej kontroli amplifikacji wykryte allele markerów pentanukleotydowych nie mogą różnić się od alleli oczekiwanych dla kontrolnego DNA 2800M Control DNA o więcej niż 1,5 pary zasad.	+	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbki pobrane od pacjentów nie podlegają ocenie.
6.3.4	Test QC pików wykraczających poza skalę	Intensywność (liczba RFU) pików rejestrowanych w przypadku określonej próbki nie może wykraczać poza maksymalny zakres detekcji aparatu do elektroforezy kapilarnej.	+, N, T	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbka nieprawidłowa
6.3.5	Test QC pików podciągniętych	Piki rejestrowane na różnych kanałach barwników dla jednakowych długości analizowanych fragmentów są oceniane pod kątem pików podciągniętych (tj. przecieku sygnału między kanałami barwników).	+, N, T	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbka nieprawidłowa
6.3.6	Test QC szerokich pików	Szerokość pików nie może przekraczać wartości określonej dla analizy pod kątem MSI.	+, N, T	Patrz przypis 4	Patrz przypis 4

6.3.7	Test QC amplifikacji alleli	Dla każdego markera musi zostać zarejestrowany co najmniej jeden allel przekraczający wartość progową analizy.	+, N, T	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Marker jest nieprawidłowy, ale interpretacja wyników dla próbki jest nadal możliwa.
6.3.8	Test QC zanieczyszczenia DNA	W przypadku próbki zdrowej tkanki dla każdego markera pentanukleotydowego można zarejestrować maksymalnie dwa allele.	+, N	Wszystkie próbki są nieprawidłowe.	Próbka nieprawidłowa
6.3.9	Test QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta	W przypadku każdego markera pentanukleotydowego allele wykryte w próbce zdrowej tkanki muszą być obecne również w próbce guza (przy czym różnica w długości nie może być większa niż 1,5 pary zasad).	T	Kontrole nie podlegają ocenie.	Patrz przypis 5
6.3.10	Test QC sygnału guza	W przypadku markerów mononukleotydowych, które zinterpretowano jako stabilne, wysokości pików alleli obecnych w próbce guza muszą być wystarczające, aby zapewnić odpowiednią czułość oznaczenia. Wymagana intensywność pików zależy od wartości progowej analizy oraz zawartości komórek nowotworowych w próbce.	T	Kontrole nie podlegają ocenie.	Marker jest nieprawidłowy, ale interpretacja wyników dla próbki jest nadal możliwa.

¹ N oznacza próbkę zdrowej tkanki; T oznacza próbkę tkanki guza; + oznacza kontrolę dodatnią; – oznacza kontrolę ujemną.

² Wynik interpretacyjny MSI dla całej partii próbek pobranych od pacjentów, gdy określony test QC próbki kontrolnej zakończył się niepowodzeniem.

³ Gdy określony test QC próbki pobranej od pacjenta zakończy się niepowodzeniem, ta kolumna pomaga określić, czy status próbki jest nieprawidłowy, czy interpretacja wyników jest nadal możliwa, pomimo nieudanej weryfikacji konkretnego markera. Podane wskazówki mają zastosowanie jedynie pod warunkiem, że próbki kontrolne pomyślnie przeszły wszystkie testy QC. Patrz wytyczne dla interpretacji w części 6.5.

⁴ Podczas kontroli QC danych należy pamiętać, że znany artefakt w postaci szerokiego pików, rejestrowany dla markera NR-21 przy długości od 83 bp do 90 bp, nie oznacza braku stabilności. Jeśli szeroki pik inny niż znany artefakt markera NR-21 zaobserwowano w przypadku próbki kontrolnej, wszystkie próbki należy uznać za nieprawidłowe, a jeśli szeroki pik inny niż znany artefakt markera NR-21 zaobserwowano w przypadku próbki pobranej od pacjenta, za nieprawidłowe należy uznać powiązane markery.

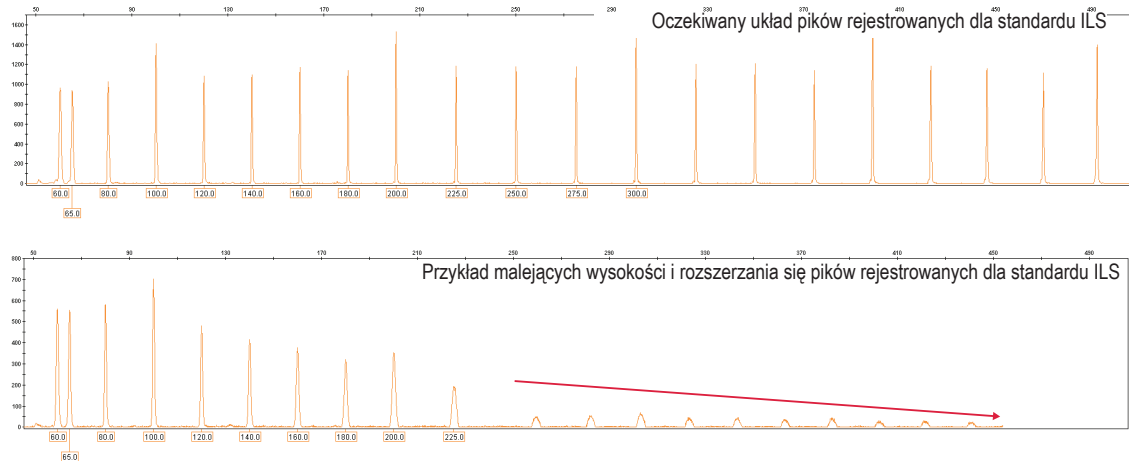
⁵ W przypadku niepowodzenia testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta z powodu braku allelu, interpretacja wyniku dla określonej próbki może być nadal możliwa zgodnie z instrukcją zamieszczoną w części 6.5.3. W przeciwnym wypadku próbka jest nieprawidłowa.

6.3.1 Ocena wszystkich próbek pod względem jakości wymiarowania (test QC jakości wymiarowania)

Skalę pomiaru jakości wymiarowania zapewnia aparatura do elektroforezy kapilarnej i/lub jest ona wyświetlana w oprogramowaniu do analizy fragmentów. Problemy dotyczące jakości wymiarowania wynikają zwykle z błędnie przeprowadzonej analizy metodą elektroforezy kapilarnej i dotyczą pojedynczych kapilar (a nie wszystkich kapilar używanych do iniekcji). Próbki, w przypadku których występują problemy z jakością wymiarowania, będą charakteryzować się brakiem (lub niewielką liczbą) pików fragmentów lub pikami fragmentów rozszerzającymi się (tj. tracącymi rozdzielczość) wraz ze wzrostem wielkości fragmentów (rysunek 9). Wszystkie próbki i kontrole należy ocenić pod kątem jakości wymiarowania, ponieważ dane wymiarowania mają decydujące znaczenie dla wyniku testu.

Aby ocenić jakość wymiarowania, należy upewnić się, że kanał barwnika dla standardu wielkości Size Standard 500 (tj. kanał pomarańczowy) jest wyświetlany w oprogramowaniu do analizy fragmentów i wykazuje oczekiwane profile pików dla fragmentów standardu wielkości o długości od 60 bp do 300 bp. Wynik próbki pobranej od pacjenta lub próbki kontrolnej jest nieprawidłowy, jeśli wykryto którąkolwiek z poniższych cech wskazujących na niską jakość wymiarowania:

- a. Jakość wymiarowania została oznaczona flagą przez oprogramowanie do gromadzenia danych z elektroforezy kapilarnej lub oprogramowanie do analizy fragmentów.
Uwaga: Do wymiarowania markerów MSI używa się wyłącznie fragmentów standardu wielkości Size Standard 500 o długości od 60 bp do 300 bp. Pozorne problemy z jakością pików standardu wielkości Size Standard 500 rejestrowane przy długości większej niż 300 bp nie mają wpływu na wymiarowanie fragmentów.
- b. Co najmniej jeden z 13 fragmentów standardu wielkości Size Standard 500 o długości od 60 bp do 300 bp (tj. 60 bp, 65 bp, 80 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp i 300 bp) nie został oznaczony lub został oznaczony nieprawidłowo. Może to być spowodowane gwałtownym spadkiem wysokości kolejnych pików lub rozszerzaniem się pików w obrębie standardu wielkości. Okazjonalnie podczas elektroforezy kapilarnej mogą zostać wykryte nieprawidłowe piki, które mogą skutkować błędną identyfikacją pików standardu wielkości.
Uwaga: „Skoki” sygnału elektroforezy kapilarnej (tj. piki o zerowej szerokości) również mogą być obecne, ale nie będą miały wpływu na wymiarowanie fragmentów, o ile nie zostały błędnie oznaczone jako piki standardu wielkości przez oprogramowanie do analizy fragmentów.



Rysunek 9. Górny panel przedstawia oczekiwany wynik dla standardu wielkości Size Standard 500. Na dolnym panelu zaobserwowano gwałtowny spadek wysokości i wzrost szerokości kolejnych pików, co wskazuje na problem z jakością wymiarowania.

6.3.2 Ocena reakcji kontroli ujemnej amplifikacji (test QC kontroli ujemnej)

Kontrolę ujemną amplifikacji należy przeanalizować razem z próbkami pobranymi od pacjentów. Piki fragmentów o intensywności przekraczającej wartość progową analizy zarejestrowane na kanałach barwników próbki (tj. kanale niebieskim, zielonym i żółtym/czarnym) dla kontroli ujemnej amplifikacji sugerują, że mogło dojść do zanieczyszczenia. Jeśli kontrolna ujemna jest zanieczyszczona, ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. A zatem, w przypadku niepowodzenia testu QC próbki kontroli ujemnej, wszystkie próbki pobrane od pacjentów, które wchodzi w skład tej partii, należy uznać za nieprawidłowe.

6.3.3 Ocena markerów powtórzeń pentanukleotydów w reakcji kontroli dodatniej pod kątem tożsamości (test QC tożsamości kontroli dodatniej)

Dodatnią próbkę kontrolną amplifikacji, przygotowaną z wykorzystaniem kontrolnego DNA 2800M Control DNA, należy przeanalizować razem z próbkami pobranymi od pacjentów, aby potwierdzić prawidłowość oznaczenia (tj. uzyskanie oczekiwanych wyników). Test QC tożsamości kontroli dodatniej przeprowadza się z wykorzystaniem markerów Penta D i Penta C. Dodatnia próbka kontrolna amplifikacji wykazuje obecność dwóch alleli każdego markera powtórzeń pentanukleotydów, przy czym z oceny wiarygodności (przeprowadzonej w warunkach wymienionych w załącznikach B i C) wynika, że wielkość wykrywanych alleli (mierzona w bp) mieści się w następujących zakresach:

- Penta D: 193,5–196,5 i 199–202
- Penta C: 176,5–179,5 i 182–185

Jeśli kontrola dodatnia nie spełnia powyższych kryteriów, ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. A zatem, w przypadku niepowodzenia testu QC próbki kontroli dodatniej, wszystkie próbki pobrane od pacjentów, które wchodzi w skład tej partii, należy uznać za nieprawidłowe.

6.3.4 Ocena intensywności pików pod kątem wyników wykraczających poza skalę (test QC pików wykraczających poza skalę)

Aparaty do elektroforezy kapilarnej cechuje ograniczony zakres detekcji sygnałów fluorescencyjnych pochodzących z fragmentów DNA znakowanych barwnikiem. W niektórych sytuacjach intensywność sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z produktów zamplifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System może przekraczać górny próg wykrywalności detektora. W takim przypadku aparat oznaczy wynik testu QC pików wykraczających poza skalę flagą, która będzie wyświetlana w oprogramowaniu do analizy fragmentów. Piki o intensywności wykraczającej poza skalę mogą powodować przecieki sygnału do innych kanałów barwników (rysunek 10 w części 6.3.5). Z uwagi na fakt, że układ pików powstały wskutek przecieku przypomina oryginalny wzorec sygnału, taki przeciek może być mylnie uznany za wykrycie obecności allelu w próbce zdrowej tkanki lub próbce tkanki guza, co utrudnia interpretację wyników pod kątem MSI. Jeśli zaobserwowano wyniki wykraczające poza skalę, próbkę pobraną od pacjenta lub próbkę kontrolną należy uznać za nieprawidłową. Wyniki wykraczające poza skalę zaobserwowane w przypadku kontroli dodatnich amplifikacji 2800M sugerują problem systemowy podczas przygotowywania lub amplifikowania reakcji przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System i oznaczają, że ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. Jeśli test QC kontroli dodatniej pod kątem pików wykraczających poza skalę zakończył się niepowodzeniem, wszystkie próbki w tej partii należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9. Ocenę danych pod kątem wyników wykraczających poza skalę należy przeprowadzić w odniesieniu do każdej analizowanej próbki oraz kontroli amplifikacji 2800M.

6.3.5 Ocena wszystkich markerów pod kątem pików podciągniętych (test QC pików podciągniętych)

Gdy zaobserwowano wyniki wykraczające poza skalę, lub gdy kalibracja spektralna aparatu do elektroforezy kapilarnej jest niewłaściwa (np. z powodu regulacji elementów optycznych podczas wykonywania prac serwisowych), sygnał fluorescencyjny pochodzący z fragmentów znakowanych barwnikiem może zostać wykryty poza docelowym kanałem barwnika, przy czym wielkość (liczba bp) dla takiego sygnału jest zbliżona do wartości rejestrowanej dla „prawdziwego” sygnału. W takiej sytuacji mówi się o „pikach podciągniętych” lub „przeciekach”. Gdy przeciek zostanie wykryty na innych kanałach barwników, wynik testu QC może zostać oznaczony flagą przez oprogramowanie do analizy fragmentów.

Aby odpowiednio skonfigurować parametry wykrywania pików podciągniętych, należy zapoznać się z instrukcją techniczną wybranego oprogramowania do analizy fragmentów. Parametry odpowiadające użytym w trakcie oceny wydajności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wymieniono w załączniku C.

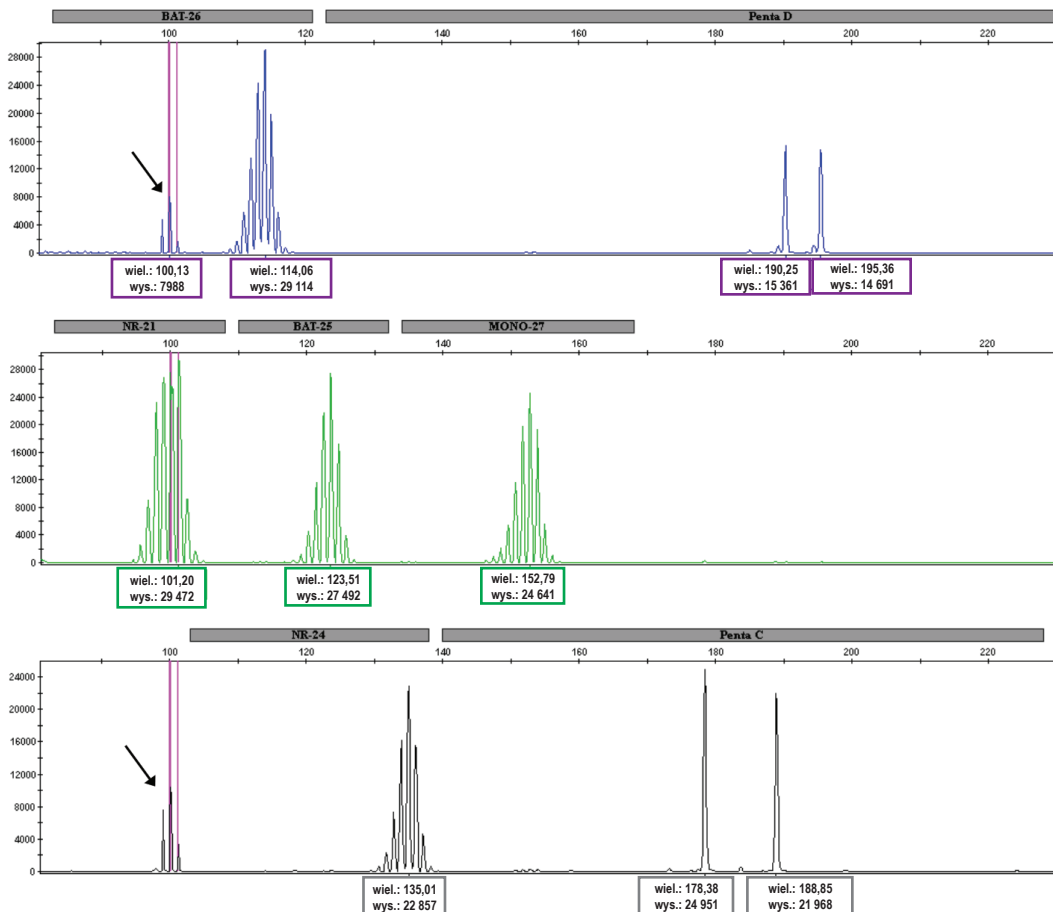
Z uwagi na fakt, że układ pików przypomina oryginalny wzorec sygnału, taki przeciek może być mylnie uznany za wykrycie obecności allelu w próbce zdrowej tkanki lub próbce tkanki guza, co utrudnia interpretację wyników pod kątem MSI. Przecieki sygnału rejestrowane dla kontroli dodatnich amplifikacji 2800M oznaczają, że ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. Dlatego próbki pobrane od pacjentów lub próbki kontrolne, w przypadku których zaobserwowano przeciek powyżej wartości progowej analizy, należy uznać za nieprawidłowe. Ocenę danych pod kątem przecieków należy przeprowadzić w odniesieniu do wszystkich analizowanych

próbek pobranych od pacjentów oraz dodatniej kontroli amplifikacji. Aby ocenić próbki pod kątem pików wywołanych przeciekami, należy wyświetlić wszystkie kanały barwników jeden pod drugim (rysunek 10). Należy zwrócić uwagę na piki dla tych samych wielkości fragmentów rejestrowane na co najmniej dwóch różnych kanałach barwników.

„Prawdziwe” piki na kanale barwnika będzie cechowała znacznie wyższa intensywność niż piki wywołane przeciekami, które zarejestrowano na innych kanałach barwników. W przypadku fragmentów uzyskanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System możliwe są następujące wzorce przecieków:

- a. piki dla markera BAT-26 rejestrowane w panelach markerów NR-21 lub BAT-25;
- b. piki dla markera Penta D rejestrowane w panelach markerów BAT-25 lub MONO-27;
- c. piki dla markera NR-21 rejestrowane w panelach markerów BAT-26 lub NR-24;
- d. piki dla markera BAT-25 rejestrowane w panelach markerów BAT-26, Penta D lub NR-24;
- e. piki dla markera MONO-27 rejestrowane w panelach markerów Penta D, NR-24 lub Penta C;
- f. piki dla markera NR-24 rejestrowane w panelach markerów NR-21, BAT-25 lub MONO-27;
- g. piki dla markera Penta C rejestrowane w panelu markera MONO-27.

W niektórych sytuacjach „prawdziwe” piki fragmentów o tej samej wielkości mogą być rejestrowane na różnych kanałach barwników i mylnie uznane za przeciek. W takich przypadkach należy ponownie przeprowadzić kalibrację spektralną aparatu do elektroforezy kapilarnej, a następnie powtórzyć oznaczenie, aby upewnić się, że dane są prawidłowe i zostaną właściwie zinterpretowane pod kątem MSI.



16186TA

Rysunek 10. Próbkę zdrowej tkanki z wynikiem wykraczającym poza skalę i wyraźnym przeciekiem między kanałami barwników. Ponieważ intensywność pików rejestrowanych dla markera NR-21 przekracza wartość graniczną detekcji aparatu do elektroforezy kapilarnej, taki wynik zostaje oznaczony flagą jako wykraczający poza skalę, a podobny pik wywołany przeciekiem można zauważyć również przy innych markerach. **Panel A.** Markery analizowane na niebieskim kanale, z zaznaczeniem skupiska pików podciągniętych wywołanych przeciekiem sygnału markera NR-21 do panelu markera BAT-26. **Panel B.** Markery analizowane na zielonym kanale, z zaznaczeniem pików fragmentów wykraczających poza skalę rejestrowanych dla markera NR-21. **Panel C.** Markery rejestrowane na żółtym/czarnym kanale; piki podciągnięte wywołane przeciekiem sygnału markera NR-21 do tego kanału barwnika nie mieszczą się w panelach markerów.

6.3.6 Ocena wszystkich markerów pod kątem szerokich pików (test QC szerokich pików)

Podczas analizy danych wygenerowanych przez system do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System można zauważyć szerokie piki fragmentów, które mogą zostać uznane za allele. Takie piki charakteryzują się łagodnym wzrostem i spadkiem intensywności na odcinku kilku par zasad i łatwo je odróżnić od „prawdziwych” pików fragmentów, które cechuje ostry kształt i szerokość od 1 bp do 2 bp. Szerokie piki obserwuje się sporadycznie, gdy amplifikacja metodą PCR lub analiza metodą elektroforezy kapilarnej zostały przeprowadzone nieprawidłowo. Znany artefakt amplifikacji w postaci szerokiego piku często obserwuje się w zakresie długości od 83 bp do 90 bp, który odpowiada markerowi NR-21 systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System (więcej informacji na ten temat zawiera część 6.2). W przypadku zaobserwowania szerokich pików wynik testu QC może zostać oznaczony flagą przez oprogramowanie do analizy fragmentów.

Aby odpowiednio skonfigurować parametry wykrywania szerokich pików, należy zapoznać się z instrukcją techniczną wybranego oprogramowania do analizy fragmentów. Parametry odpowiadające użytym w trakcie oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wymieniono w załączniku C (w części 11.3).

Próbki pobrane od pacjentów oraz próbki kontrolne należy sprawdzić pod kątem szerokich pików poszczególnych markerów, które zidentyfikowano jako piki alleli. Szeroki pik markera NR-21 obserwowany w zakresie od 83 bp do 90 bp nie ma związku z niestabilnością mikrosatelitarną, a jego wykrycie nie oznacza niepowodzenia testu QC szerokich pików. Wykrycie szerokiego piku dla jednego lub większej liczby markerów ma negatywny wpływ na jakość danych. Jednakże interpretacja danych w odniesieniu do markerów, których ten problem nie dotyczy, może być nadal możliwa zgodnie z instrukcją w części 6.5. Szerokie piki rejestrowane dla próbek kontrolnych mogą oznaczać możliwe problemy z jakością danych uzyskiwanych z całej partii próbek. Jeśli test QC próbki kontrolnej pod kątem szerokich pików zakończył się niepowodzeniem, wszystkie próbki w tej partii należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9.

6.3.7 Ocena wszystkich markerów pod kątem amplifikacji alleli (test QC amplifikacji alleli)

Należy sprawdzić, czy dla poszczególnych markerów obecnych w próbkach pobranych od pacjentów oraz kontrolach dodatnich 2800M zostały zarejestrowane „prawdziwe” piki fragmentów o intensywności przekraczającej wartość progową analizy (patrz części 3.9 i 7.5). Jeśli w przypadku jednego lub większej liczby markerów nie wykryto żadnych alleli, oznacza to pogorszenie jakości próbki. Należy udokumentować wyniki dla markerów, które nie przeszły pomyślnie testu QC amplifikacji alleli. Jednakże interpretacja danych w odniesieniu do markerów, których ten problem nie dotyczy, może być nadal możliwa zgodnie z instrukcją w części 6.3. **Uwaga:** Aby można było zinterpretować wyniki dla określonego markera powtórzeń mononukleotydów, co najmniej jeden allel tego markera musi zostać wykryty zarówno w próbce zdrowej tkanki, jak i w próbce tkanki guza. Brakujące allele w kontroli dodatniej amplifikacji 2800M oznaczają, że ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. Jeśli test QC próbki kontroli dodatniej pod kątem amplifikacji alleli zakończył się niepowodzeniem, wszystkie próbki w tej partii należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9.

6.3.8 Ocena kontroli dodatniej amplifikacji i próbek zdrowej tkanki pobranych od pacjentów pod kątem zanieczyszczenia DNA (test QC zanieczyszczenia DNA)

Analiza liczby wykrytych alleli markerów powtórzeń pentanukleotydów może w niektórych przypadkach dostarczyć informacji o zanieczyszczeniu próbki ludzkim DNA pochodzącym z zewnętrznych źródeł. Należy zliczyć allele zidentyfikowane dla poszczególnych markerów powtórzeń pentanukleotydów w kontroli dodatniej amplifikacji i próbkach zdrowej tkanki pobranych od pacjentów. Niepowodzenie testu QC zanieczyszczenia DNA stwierdza się w przypadku wykrycia trzech lub większej liczby alleli markerów Penta C lub Penta D. Niestabilność genomowa powiązana z niektórymi rodzajami guzów może skutkować obecnością więcej niż dwóch alleli w próbce guza. A zatem ocena próbek guza pobranych od pacjentów za pomocą testu QC zanieczyszczenia DNA nie dostarcza żadnych istotnych informacji. Niepowodzenie tego testu QC w przypadku próbki kontroli dodatniej amplifikacji 2800M oznacza, że ewentualne problemy z jakością danych mogą dotyczyć całej partii próbek. Jeśli test QC próbki kontroli dodatniej pod kątem zanieczyszczenia DNA zakończył się niepowodzeniem, wszystkie próbki w tej partii należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9. próbki zdrowych tkanek pacjenta, które nie przeszły pomyślnie testu QC zanieczyszczenia DNA, należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9.

6.3.9 Ocena markerów powtórzeń pentanukleotydów w próbkach pobranych od pacjenta pod kątem tożsamości (test QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta)

Należy porównać allele poszczególnych markerów powtórzeń pentanukleotydów, aby upewnić się, że próbki zdrowej tkanki i tkanki guza pochodzą od tego samego pacjenta. Pozytywny wynik testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta oznacza, że wszystkie allele wykryte w próbce zdrowej tkanki są obecne również w próbce guza. Niestabilność genomowa powiązana z niektórymi rodzajami guzów może sprawić, że w próbce guza obecnych będzie więcej lub mniej alleli niż w próbce zdrowej tkanki. Obecność dodatkowych alleli w próbce guza nie oznacza niepowodzenia testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta. Dodatkowe allele markerów Penta w próbce guza nie oznaczają MSI. Natomiast brakujący allel w próbce guza może oznaczać zamięszenie próbki lub utratę heterozygotyczności (LOH) markera (patrz część 6.5.3). Interpretacja wyników dla par próbek, które nie przeszły pomyślnie testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta z powodu brakującego allelu w próbce guza, jest nadal możliwa zgodnie z wytycznymi zamieszczonymi w części 6.5.3. Pary próbek, które nie przeszły pomyślnie testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta z innych powodów, należy uznać za nieprawidłowe i postępować zgodnie z instrukcjami w części 9. W przypadku kontroli dodatnich i ujemnych nie przeprowadza się testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta.

6.3.10 Ocena markerów powtórzeń mononukleotydów w próbkach guza pod kątem intensywności sygnału (test QC sygnału guza)

Jeśli w próbce guza nie wykryto żadnego nowego allelu konkretnego markera powtórzeń mononukleotydów w porównaniu do próbki zdrowej tkanki, taki marker uznaje się za stabilny. Jednakże, aby nowe allele mogły zostać wykryte powyżej wartości progowej analizy, standardowy („wzorcowy”) allel w próbce guza musi wykazywać wystarczającą intensywność sygnału przy określonej zawartości komórek nowotworowych w próbce. A zatem należy sprawdzić intensywność pików dla każdego pozornie stabilnego markera powtórzeń mononukleotydów i ustalić, czy intensywność sygnału allelu jest wystarczająca, aby zapewnić czułość oznaczenia odpowiednią do wykrywania nowych alleli.

Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wartość progową analizy określono na 175 RFU przy minimalnej zawartości komórek nowotworowych wynoszącej 20%, co odpowiada frakcji komórek nowotworowych równej 0,2. Aby zapewnić odpowiednią czułość oznaczenia, minimalną wymaganą intensywność pików standardowego allelu, która dla pozornie stabilnych markerów powtórzeń mononukleotydów w próbkach guza wynosi 700 RFU, obliczono przy użyciu następującego wzoru:

$$\text{intensywność sygnału guza (RFU)} \geq \text{wartość progowa analizy} \times \frac{1}{\text{Minimalna frakcja komórek nowotworowych}} \times (1 - \text{minimalna frakcja komórek nowotworowych})$$

Przy minimalnej intensywności pików wynoszącej 700 RFU oczekiwana wysokość pików nowego allelu przy zawartości komórek nowotworowych równej 20% łącznej objętości próbki (co odpowiada frakcji guza 0,2) wynosi 175 RFU (tj. 175 RFU stanowi 20% całkowitej intensywności sygnału wynoszącej 875 RFU, a 700 RFU to 80% całkowitej intensywności sygnału wynoszącej 875 RFU). A zatem intensywność sygnału jest wystarczająca, aby można było wiarygodnie określić stabilność markerów obecnych w próbkach o zawartości komórek nowotworowych $\geq 20\%$. Należy udokumentować wyniki dla markerów, które nie przeszły pomyślnie testu QC sygnału guza. Jednakże interpretacja danych w odniesieniu do markerów, których ten problem nie dotyczy, może być nadal możliwa zgodnie z instrukcją w części 6.5. W przypadku kontroli dodatnich i ujemnych nie przeprowadza się testu QC sygnału guza.

6.4 Określanie stabilności markerów powtórzeń mononukleotydów

Analiza markerów powtórzeń mononukleotydów w odpowiadających sobie próbkach zdrowej tkanki i próbkach tkanki guza pozwala określić stabilność markerów, a tym samym status MSI guza. Stabilność ocenia się kolejno dla poszczególnych markerów, a niestabilność określa się na podstawie obecności jednego lub większej liczby nowych alleli mikrosatelitarnych w próbce guza w porównaniu do próbki zdrowej tkanki pobranej od tego samego pacjenta. Zmiany alleli w niektórych guzach mogą być na tyle niewielkie, że obecnie stosowane oprogramowanie do analizy fragmentów nie jest w stanie ich wykryć jako odrębnych nowych alleli. W przypadku takich próbek niestabilność można określić na podstawie wizualnego porównania elektroferogramów pod kątem różnic. W innych próbkach guza, na przykład pobranych od pacjentów z CRC o wysokiej MSI, zmiany w profilach mikrosatelitarnych są wyraźne i rejestruje się odrębne piki dla nowych alleli, z towarzyszącymi pikami satelitarnymi o malejącej intensywności. Gdy stabilność markera budzi wątpliwości lub nie można jej określić, powtórzona analiza próbki przy zastosowaniu zwiększonej zawartości komórek nowotworowych i/lub innego czasu lub czasów iniekcji elektroforezy kapilarnej może dostarczyć dodatkowych informacji (Guedes, 2017; Wang, 2017; Boyle, 2014). Proces określania stabilności markera podsumowano na rysunku 11. W tabeli 6 podsumowano możliwe wyniki analizy w celu określenia stabilności markerów powtórzeń mononukleotydów. Nie można określić stabilności markerów w próbkach pobranych od pacjenta, które uznano za nieprawidłowe z powodu krytycznego niepowodzenia kontroli QC danych (patrz część 6.3).

Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System zastosowano prosty algorytm określania stabilności markerów: W przypadku każdego z pięciu markerów powtórzeń mononukleotydów w próbkach zdrowej tkanki i próbkach tkanki guza pobranych od pacjentów najmniejszy zidentyfikowany allel uznawano za allel będący przedmiotem zainteresowania do dalszych porównań. Następnie obliczano różnicę wielkości alleli będących

przedmiotem zainteresowania w próbkach zdrowej tkanki i próbkach tkanki guza, aby określić stabilność markera. Gdy ta różnica wynosiła ≥ 3 bp (przy czym w praktyce zastosowano wartość $\geq 2,75$ bp, aby uwzględnić precyzję wymiarowania aparatu do elektroforezy kapilarnej), marker uznawano za niestabilny.

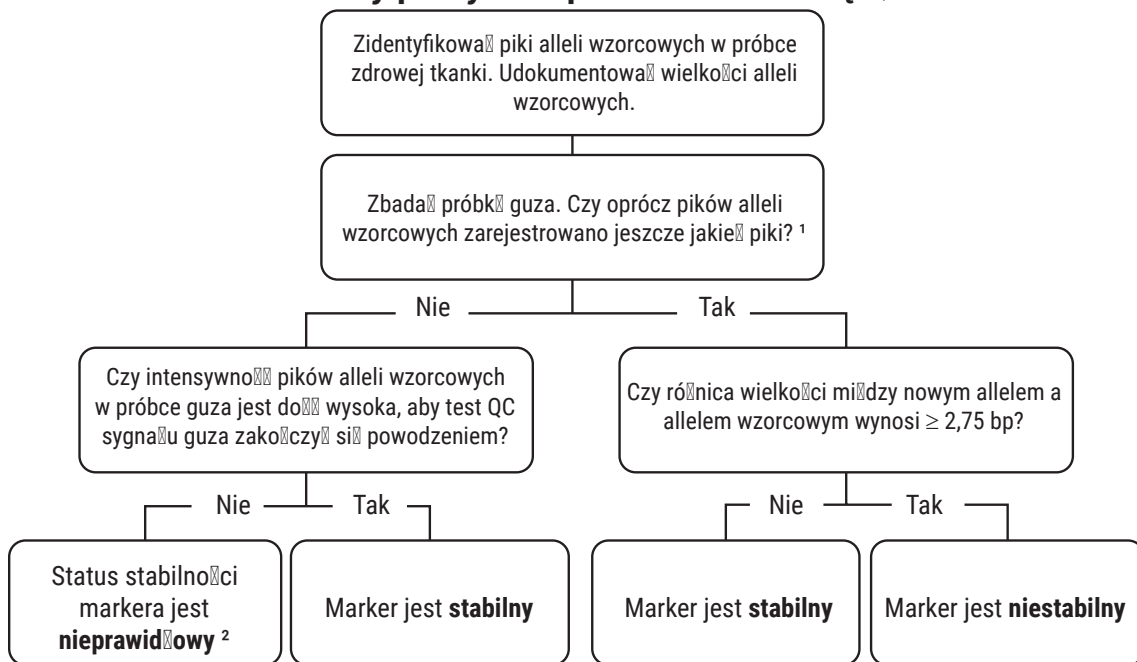
Tabela 6. Określanie stabilności markerów powtórzeń mononukleotydów na podstawie porównania alleli obecnych w próbkach zdrowej tkanki i próbkach tkanki guza.

Status stabilności markera

Status stabilności przypisywany każdemu markerowi w próbce

Wartość	Opis
Stabilny	Nie wykryto niestabilności mikrosatelitarnej markera powtórzeń mononukleotydów. Nie wykryto żadnych nowych alleli w próbce guza lub różnica wielkości między nowym allelem w próbce guza a allelem wzorcowym w próbce zdrowej tkanki nie była znacząca ($< 2,75$ bp).
Niestabilny	Wykryto niestabilność mikrosatelitarną markera powtórzeń mononukleotydów. Wykryto nowy allel w próbce guza, a różnica wielkości między tym allelem a allelem wzorcowym w zdrowej tkance była znacząca ($\geq 2,75$ bp).
Nieprawidłowy	Ocena markera powtórzeń mononukleotydów pod kątem niestabilności mikrosatelitarnej nie była możliwa. Jakość danych próbki uznano za niewystarczającą z powodu krytycznego niepowodzenia kontroli QC (patrz część 6.3).

W przypadku każdego markera powtórzeń mononukleotydów, który pomyślnie przeszedł kontrolę QC:



1. Próbkę guza często zawierają mieszaninę zdrowych i nowotworowych komórek; obecność standardowego allelu wzorcowego w próbce guza jest częstym zjawiskiem.
2. Dodatkowe informacje można znaleźć w części 9 – Rozwiązywanie problemów.

Rysunek 11. Ogólne instrukcje oceny stabilności markerów powtórzeń mononukleotydów w próbkach pobranych od pacjentów. Jeśli określony marker powtórzeń mononukleotydów spełnia wymagania kontroli QC danych określone w części 6.3, należy postępować zgodnie z instrukcjami na schemacie. Należy udokumentować stabilność poszczególnych markerów, a następnie przejść do części 6.5 — Interpretacja statusu MSI guza. **Uwaga:** Aby można było zinterpretować wyniki dla określonego markera powtórzeń mononukleotydów, taki marker musi pozytywnie przejść wszystkie kontrole QC, zarówno w próbce zdrowej tkanki, jak i w próbce tkanki guza.

6.5 Interpretacja statusu MSI guza

6.5.1 Podsumowanie

Proces interpretacji statusu MSI próbki na podstawie statusów stabilności określonych dla markerów systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System podsumowano na rysunku 12. W tabeli 7 podsumowano końcowe rezultaty interpretacji statusu MSI próbek guza. Ta metoda jest zgodna z zasadami określania statusu MSI próbek przyjętymi w drodze konsensusu podczas Warsztatów Amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka na temat Niestabilności Mikrosatelitarnej (Boland, 1998). Jeśli nie stwierdzono żadnych krytycznych niepowodzeń kontroli QC, status MSI próbki interpretuje się w następujący sposób:

Próbka guza jest interpretowana jako MSI-H, gdy co najmniej dwa markery powtórzeń mononukleotydów są niestabilne. Probka guza jest interpretowana jako MSS, gdy mniej niż dwa markery powtórzeń mononukleotydów zostają zinterpretowane jako niestabilne (Boland, 1998; Hampel, 2008; Umar, 2004).

Określenie statusu MSI jest nadal możliwe, gdy uzyskano nieprawidłowe wyniki dla podzbioru markerów (patrz część 6.5.2) lub gdy test QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta zakończył się niepowodzeniem (patrz część 6.5.3). Instrukcje interpretacji wyników dla takich próbek przedstawiono poniżej. Wyniki dla próbek, w których stwierdzono obecność mniej niż dwóch prawidłowych markerów powtórzeń mononukleotydów, nie mogą być interpretowane. W takim przypadku należy postępować zgodnie z instrukcjami w części 9.

Tabela 7. Status MSI guza określony na podstawie sumy wyników stabilności markerów.

Wartość	Opis
MSS	Status MSS (stabilny mikrosatelitarne) oznacza, że niestabilność stwierdzono w przypadku mniej niż dwóch markerów powtórzeń mononukleotydów.
MSI-H	Status MSI-H (wysoce niestabilny mikrosatelitarne) oznacza, że niestabilność stwierdzono w przypadku co najmniej dwóch markerów powtórzeń mononukleotydów.
Nieprawidłowy	Status nieprawidłowy oznacza, że jakość danych próbki uznano za niewystarczającą z powodu krytycznego niepowodzenia kontroli QC danych (patrz tabela 5). Interpretacja takich danych pod kątem MSI nie jest możliwa. Gdy kontrola QC danych dotyczących partii próbek zakończy się niepowodzeniem z powodu problemu z dodatnią lub ujemną kontrolą amplifikacji, wyniki dla wszystkich próbek w tej partii należy zinterpretować jako nieprawidłowe. Instrukcje postępowania w przypadku niepowodzenia kontroli QC skutkującej nieprawidłowymi wynikami można znaleźć w części podręcznika poświęconej rozwiązywaniu problemów.

6.5.2 Interpretacja pod kątem MSI w przypadku uzyskania nieprawidłowych wyników stabilności dla podzbioru markerów

Gdy intensywność pików alleli markerów powtórzeń mononukleotydów jest zbyt niska, aby można było ocenić dane, takie próbki wykażą niepowodzenie testu QC sygnału guza lub testu QC amplifikacji alleli, a status stabilności markerów zostanie określony jako nieprawidłowy. Gdy szeroki pik utrudnia wymiarowanie pików alleli, próbka wykaże niepowodzenie testu QC szerokich pików, a status stabilności markerów zostanie określony jako nieprawidłowy.

Gdy podzbiór markerów powtórzeń mononukleotydów obecnych w konkretnej próbce pobranej od pacjenta wykaże nieprawidłowy status stabilności, interpretacja tej próbki pod kątem MSI może być nadal możliwa, o ile zostaną spełnione następujące warunki:

1. Niskich wysokości pików markerów nie można skorygować poprzez a) zwiększenie wejściowej ilości DNA w reakcji amplifikacji przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System lub b) ponowną analizę z użyciem innego wycinka tkanki FFPE.
2. Oba markery powtórzeń pentanukleotydów pomyślnie przeszły wszystkie testy kontroli QC.
3. Jedyne zaobserwowane niepowodzenia kontroli QC danych dotyczą testu QC sygnału guza, testu QC amplifikacji alleli i/lub testu QC szerokich pików.
4. Status stabilny lub niestabilny przypisano co najmniej dwóm markerom powtórzeń mononukleotydów.

Jeśli powyższe warunki zostały spełnione, wynik dla próbki można zinterpretować na podstawie pozostałych, prawidłowych danych stabilności zgodnie z poniższymi wytycznymi (Boland, 1998):

1. Jeśli co najmniej dwa markery powtórzeń mononukleotydów są niestabilne, wynik dla próbki guza należy zinterpretować jako MSI-H.
2. Jeśli co najmniej cztery markery powtórzeń mononukleotydów są stabilne, wynik dla próbki guza należy zinterpretować jako MSS.
3. W przeciwnym wypadku nie można zinterpretować wyników dla próbki. Status MSI próbki zostanie określony jako nieprawidłowy.

6.5.3 Interpretacja pod kątem MSI w przypadku niepowodzenia kontroli QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta

Markery pentanukleotydowe w próbkach guza mogą tracić allele lub wykazywać obecność dodatkowych alleli, które utrudniają interpretację tożsamości względem próbek zdrowej tkanki. Do zdarzeń genomowych często obserwowanych w tkance guza należą LOH i uogólniona niestabilność genomowa. Takie zdarzenia mogą utrudniać weryfikację tożsamości próbki (tj. potwierdzenie, że próbka zdrowej tkanki i próbka tkanki guza pochodzą od tego samego pacjenta). Markery powtórzeń pentanukleotydów mogą wykazywać różną liczbę alleli w próbce guza i odpowiadającej jej próbce zdrowej tkanki. Obecność dodatkowych alleli w próbce guza nie skutkuje niepowodzeniem kontroli QC danych.

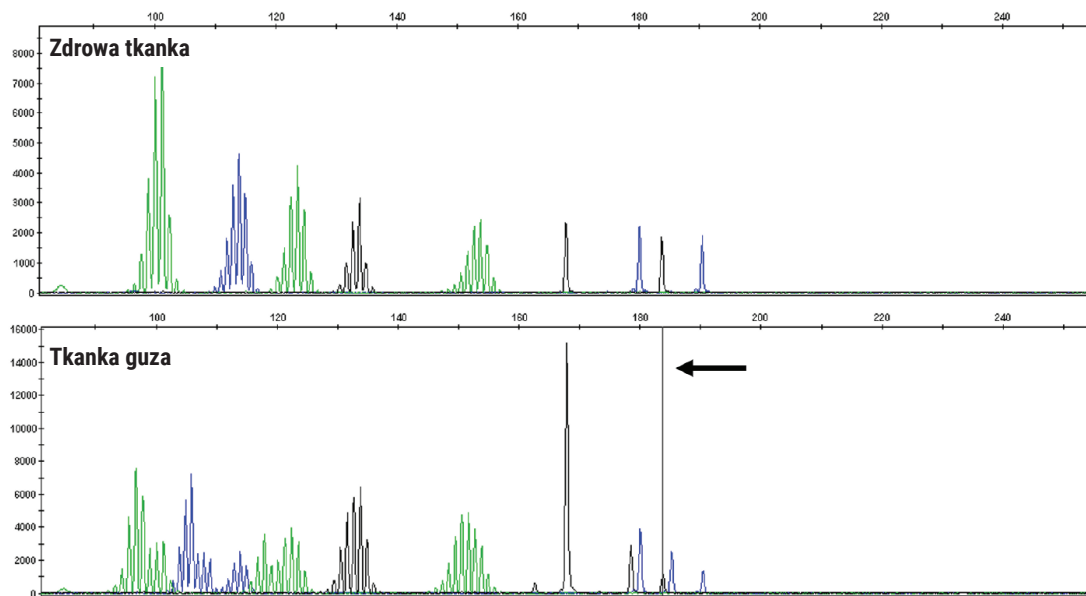
Z drugiej strony, przypadki wyraźnego braku równowagi allelicznej (np. utrata heterozygotyczności, LOH) mogą skutkować obecnością w próbce zdrowej tkanki allelu pentanukleotydowego, którego nie wykryto w próbce guza. Poważny brak równowagi allelicznej obserwuje się w przypadku utraty jednego z alleli pentanukleotydów w tkance guza w porównaniu do zdrowej tkanki (tj. w przypadku znacznego zmniejszenia wysokości pików tego allelu, przez co nie jest on wykrywany). Może to skutkować pozornym niepowodzeniem testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta. Aby potwierdzić, że taki „utracony” allel jest obecny powyżej wartości progowej analizy i został jedynie odfiltrowany przez algorytm określania wielkości alleli oprogramowania, należy otworzyć plik próbki w oprogramowaniu do analizy fragmentów i przytrzymać kursor nad „utraconym” pikiem na elektroferogramie dla próbki guza. Po przytrzymaniu kursora nad potencjalnym „utraconym” pikiem w oprogramowaniu GeneMapper® zostanie wyświetlona pionowa czarna linia oznaczająca, że ten pik przekroczył wartość progową analizy, ale został odfiltrowany, a zatem allel nie został zidentyfikowany (rysunek 13). Alternatywnie można powiększyć potencjalny „utracony” pik, aby upewnić się, że jego intensywność przekracza wartość progową analizy. Jeśli wybrane oprogramowanie do analizy fragmentów nie obsługuje tej funkcji, należy sprawdzić, czy wysokość pików utraconego allelu przekracza wartość progową analizy.

Gdy w przypadku próbki pobranej od pacjenta stwierdzono pozorne niepowodzenie testu QC tożsamości próbek pobranych od pacjenta, interpretacja pod kątem MSI może być nadal możliwa, o ile zostaną spełnione następujące warunki:

1. Niepowodzenie kontroli QC stwierdzono w przypadku pojedynczego markera powtórzeń pentanukleotydów (tj. albo markera Penta C, albo markera Penta D, ale nie obu tych markerów jednocześnie).
2. „Utracony” allel obecny w zdrowej tkance jest również obecny w tkance guza, na co wskazuje pik o intensywności powyżej wartości granicznej analizy, ale pik ten został odfiltrowany jako pik satelitarny przez algorytm określania wielkości alleli oprogramowania do analizy fragmentów z powodu zarejestrowania dużo wyższego pików dla innego allelu w tym samym panelu.
3. Markery powtórzeń mononukleotydów pomyślnie przeszły kontrolę QC.

Jeśli powyższe warunki zostały spełnione, dane można zinterpretować zgodnie z poniższymi wytycznymi:

1. Jeśli co najmniej dwa markery powtórzeń mononukleotydów są niestabilne, wynik dla próbki guza należy zinterpretować jako MSI-H.
2. Jeśli co najmniej cztery markery powtórzeń mononukleotydów są stabilne, wynik dla próbki guza należy zinterpretować jako MSS.



16189TA

Rysunek 13. Przykład wyraźnego braku równowagi allelicznej. W przypadku wyraźnego braku równowagi allelicznej markerów powtórzeń pentanukleotydów wyświetlenie pionowej czarnej linii po przytrzymaniu kursora nad pikiem zarejestrowanym dla próbki zdrowej tkanki, ale „utraconym” na elektroferogramie próbki guza, oznacza, że ten pik jest obecny, a jego intensywność przekracza wartość progową analizy, ale został odfiltrowany jako pik satelitarny z powodu zarejestrowania dużo wyższego pików dla allelu o długości 168 bp w tym samym panelu.

7. Kontrole jakości oznaczenia

7.1 Kalibracja spektralna

W trakcie elektroforezy kapilarnej znakowane barwnikiem produkty amplifikacji uzyskane przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System są rozdzielane według rozmiarów i wykrywane. Przed analizą wybrany aparat do elektroforezy kapilarnej jest kalibrowany przy użyciu standardów matrycy, aby umożliwić rozróżnianie poszczególnych barwników użytych w oznaczeniu. Standard matrycy OncoMate™ 5C Matrix Standard (nr kat. firmy Promega: MD3580) składa się z fragmentów DNA znakowanych pięcioma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (fluoresceiną, JOE, TMR-ET, CXR-ET i WEN), umieszczonych w jednej probówce. Kalibrację spektralną należy przeprowadzić zgodnie z ogólnymi parametrami wymienionymi w załączniku A (część 11.1). Wygenerowany plik kalibracji spektralnej jest stosowany automatycznie podczas wykrywania próbek, aby uwzględnić nakładanie się widm barwników, jak również aby rozdzielić nieprzetworzone sygnały fluorescencji na sygnały rejestrowane dla poszczególnych barwników.

7.2 Próbką zdrowej tkanki odpowiadająca próbce tkanki guza

Markery powtórzeń mononukleotydów mogą wykazywać heterozygotyczność, czyli różną długość alleli w próbkach zdrowej tkanki pobranych od różnych osób (Bacher, 2004). Aby uwzględnić takie różnice w allelach obecnych w zdrowej tkance, jednocześnie z próbką tkanki guza należy analizować odpowiadającą jej próbkę zdrowej tkanki. Ponadto analiza próbki zdrowej tkanki może być istotna podczas oceny próbki guza pod kątem niewielkich zmian długości alleli. Próbki guza zwykle zawierają mieszaninę zdrowych i nowotworowych komórek. Piki nowych alleli w próbce guza mogą nakładać się na piki satelitarne zdrowych komórek obecnych w próbce guza. W takich przypadkach interpretacja danych może wymagać bezpośredniego porównania tkanki guza ze zdrową tkanką. Jeśli analiza próbki tkanki guza lub próbki zdrowej tkanki musi zostać powtórzona z jakiegokolwiek powodu, należy przeanalizować również drugą próbkę z pary, aby uwzględnić możliwe różnice między poszczególnymi cyklami.

7.3 Kontrola dodatnia i kontrola ujemna

Reakcje amplifikacji kontroli dodatniej i kontroli ujemnej (bez matrycy), przeprowadzane przy użyciu odpowiednio kontrolnego DNA 2800M Control DNA lub wody do amplifikacji, należy analizować razem z próbkami pobranymi od pacjentów, aby zweryfikować wiarygodność oznaczenia. Każda mikro płytką z próbkami pobranymi od pacjentów musi zawierać również co najmniej jedną reakcję amplifikacji kontrolnego DNA 2800M Control DNA i jedną reakcję amplifikacji kontroli ujemnej. Reakcję kontroli ujemnej analizuje się, aby upewnić się, że w reakcjach bez matrycy nie nastąpiła nieprzewidziana amplifikacja. Nieprzewidziana amplifikacja w reakcji kontroli ujemnej sugeruje, że doszło do zanieczyszczenia DNA, przez co wynik oznaczenia jest nieprawidłowy. W przypadku kontroli ujemnych nie powinno się rejestrować pików amplifikacji o intensywności przekraczającej wartość progową analizy. Reakcje kontroli dodatniej analizuje się, aby wykazać, że reakcja chemiczna amplifikacji przebiegła zgodnie z przewidywaniami. Jeśli wyniki dla kontroli dodatniej są niezgodne z oczekiwaniami, może to oznaczać, że amplifikacja się nie powiodła lub jej wydajność jest niezadowalająca. Oczekiwane wyniki dla kontrolnego DNA 2800M Control DNA podano w tabeli 8.

Tabela 8. Oczekiwane wyniki przy zastosowaniu 1 ng kontrolnego DNA 2800M Control DNA.

Nazwa markera	Allele 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

¹Wielkości alleli określono przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer z polimerem POP-7® Polymer i zestawem kapilar 50 cm. Wielkości określone przy użyciu innej aparatury lub innej konfiguracji materiałów eksploatacyjnych mogą się nieco różnić.

²Różnice w działaniu aparatów do elektroforezy kapilarnej w zależności od konkretnego aparatu i dnia przeprowadzenia procedury mogą skutkować ok. ± 1 bp różnicą wielkości alleli oczekiwanych dla kontrolnego DNA 2800M Control DNA.

7.4 Standardy do elektroforezy kapilarnej

Wszystkie analizowane próbki i kontrole muszą zawierać standard wielkości Size Standard 500. Standard wielkości Size Standard 500 składa się z serii 21 fragmentów DNA o znanych długościach (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 i 500 bp). Poszczególne fragmenty są znakowane barwnikiem WEN i wykrywane oddzielnie (jako czwarty kolor, pomarańczowy) podczas elektroforezy kapilarnej w obecności produktów zampłifikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Standard wielkości Size Standard 500 służy do przypisywania wielkości do zampłifikowanych produktów obecnych w poszczególnych próbkach i kontrolach przy użyciu metody hybrydizacji miejscowej typu Southern blot (Southern, 1979). Standard wielkości kontroluje różnice w precyzji wymiarowania poszczególnych kapilar w trakcie elektroforezy kapilarnej i umożliwia bezpośrednie porównanie próbek analizowanych w jednym cyklu elektroforezy. Wyłącznie fragmenty o długości od 60 bp do 300 bp są analizowane przy użyciu wybranego oprogramowania do analizy fragmentów.

7.5 Wartość progowa analizy

Podczas analizy danych przy użyciu oprogramowania do analizy fragmentów należy określić i zastosować wartość progową analizy, aby wyniki interpretacji pod kątem MSI były wiarygodne. Istnieje kilka metod ustalania wartości progowej analizy. Ich opisy można znaleźć w odpowiednich publikacjach naukowych (np. Bregu, 2013). Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System wartość progową analizy ustalono na 175 RFU, posługując się metodą górnej granicy opartą na regresji liniowej intensywności pików wygenerowanych z próbek zawierających różne wejściowe ilości DNA (Bregu, 2013).

8. Ograniczenia szczególne

Zawartość komórek nowotworowych w próbkach guza może mieć wpływ na identyfikację alleli przez oprogramowanie do wymiarowania fragmentów. Zawartość komórek nowotworowych musi wynosić $\geq 20\%$, a liczebność komórek jądrzastych, określana standardowymi metodami patologicznymi, musi być wystarczająca. Próbki tkanek, które nie spełniają tych kryteriów, nie mogą być analizowane przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Ocenę systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przeprowadzono przy użyciu wejściowego DNA oczyszczonego i wyekstrahowanego z próbek tkanek FFPE okrężnicy przy użyciu aparatu Maxwell® CSC Instrument oraz zestawu Maxwell® CSC FFPE DNA Kit, a uzyskane produkty amplifikacji przeanalizowano przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer z oprogramowaniem GeneMapper® Software w wersji 5.0. Przed użyciem innej metody ekstrakcji DNA, aparatu do elektroforezy kapilarnej, oprogramowania do analizy fragmentów DNA lub metody analizy użytkownik musi ustalić, czy te metody są kompatybilne z zestawem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Oprogramowanie do wymiarowania fragmentów może cechować różna zdolność identyfikacji zmienionego allelu w próbce guza lub odmiennego układu markerów mikrosatelitarnych. Aby zapewnić dokładną interpretację, należy porównać próbkę tkanki guza z próbką zdrowej tkanki pobranej od tego samego pacjenta.

Loci mikrosatelitarne wchodzące w skład systemu są quasi-monomorficzne. W rzadkich przypadkach obserwuje się heterozygotyczne układy alleli. Aby zapewnić dokładną interpretację, należy porównać próbkę tkanki guza z próbką zdrowej tkanki pobranej od tego samego pacjenta.

Aparaty i akcesoria do aparatów używanych razem z systemem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System muszą być konserwowane zgodnie z zaleceniami producenta i muszą spełniać kryteria dopuszczenia do użytkowania z niniejszym produktem.

9. Rozwiązywanie problemów

W przypadku problemów, których nie omówiono w niniejszym dokumencie, należy zapoznać się z instrukcją obsługi stosowanego aparatu lub akcesorium albo skontaktować się z lokalnym oddziałem lub dystrybutorem firmy Promega. Informacje kontaktowe są dostępne na stronie internetowej **www.promega.com** lub pod adresem e-mail: **genetic@promega.com**.

Objawy	Przyczyny i komentarze
Test QC jakości wymiarowania zakończył się niepowodzeniem z powodu niskiej rozdzielczości fragmentów standardu wielkości Size Standard 500, wykrycia mniejszej liczby fragmentów niż oczekiwana lub niskiej intensywności pików (problem może również dotyczyć amplikonów).	W płynach obecnych w aparacie znajdowały się pęcherzyki powietrza. Należy przeprowadzić procedurę usuwania pęcherzyków powietrza z płynów obecnych w aparacie zgodnie z instrukcją producenta, a następnie powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, w tym kontroli dodatnich i ujemnych, przy użyciu elektroforezy kapilarnej.
	W polimerze obecne były zanieczyszczenia lub osady kryształów. Przed uzupełnianiem polimeru należy się upewnić, że ogrzano go do temperatury pokojowej zgodnie z instrukcjami producenta. Powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, w tym kontroli dodatnich i ujemnych, przy użyciu elektroforezy kapilarnej.
	Zablokowanie jednej lub większej liczby kapilar. Należy ponownie napęłnić zestaw kapilar i powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, w tym kontroli dodatnich i ujemnych, przy użyciu elektroforezy kapilarnej. W razie konieczności należy zainstalować nowy zestaw kapilar.
	Do mieszaniny do elektroforezy kapilarnej nie dodano standardu wielkości Size Standard 500. Należy przygotować świeżą mieszaninę do elektroforezy kapilarnej, zawierającą standard wielkości Size Standard 500, i powtórzyć analizę wszystkich próbek i kontroli przy użyciu elektroforezy kapilarnej.

Objawy	Przyczyny i komentarze
Test QC jakości wymiarowania zakończył się niepowodzeniem z powodu niskiej rozdzielczości fragmentów standardu wielkości Size Standard 500, wykrycia mniejszej liczby fragmentów niż oczekiwana lub niskiej intensywności pików (problem może również dotyczyć amplikonów). (ciąg dalszy)	Końcówki kapilar nie miały styczności z mieszaniną elektroforetyczną. Należy się upewnić, że do każdego wymaganego dołka 96-dołkowej mikropłytki dodano 11 µl mieszaniny elektroforetycznej zawierającej próbki, a mikropłytkę odwirowano krótko przed rozpoczęciem cyklu elektroforezy kapilarnej. Powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, w tym kontroli dodatnich i ujemnych, przy użyciu elektroforezy kapilarnej. Aby znaleźć przyczynę źródłową błędu testu QC jakości wymiarowania, należy przeanalizować elektroferogram.
Nie udało się rozpocząć cyklu elektroforezy kapilarnej.	W płynach obecnych w aparacie do elektroforezy kapilarnej znajdowały się pęcherzyki powietrza. Należy usunąć pęcherzyki powietrza zgodnie z instrukcjami producenta. Następnie należy ponownie rozpocząć cykl elektroforezy kapilarnej.
	Wystąpił błąd w komputerze systemowym. Należy ponownie uruchomić aparat do elektroforezy kapilarnej oraz komputer aparatu zgodnie z instrukcjami producenta, a następnie ponownie rozpocząć cykl elektroforezy kapilarnej.
	Co najmniej jeden z materiałów eksploatacyjnych używanych w aparacie jest przeterminowany lub osiągnięto limit próbek przewidziany dla tego materiału. Należy wymienić przeterminowane lub zużyte materiały eksploatacyjne, a następnie ponownie rozpocząć cykl elektroforezy kapilarnej.
Test QC jakości wymiarowania zakończył się niepowodzeniem z powodu wykrycia nieprzewidzianych pików na kanale barwnika standardu wielkości Size Standard 500.	Artefakty elektroforezy kapilarnej. Podczas elektroforezy kapilarnej mogą zostać zaobserwowane nieprawidłowe piki. Jeśli dotyczy to pomarańczowego kanału barwnika, takie nieprawidłowe piki mogą nałożyć się na piki standardu wielkości Size Standard 500 lub wielkości mogą zostać nieprawidłowo przypisane przez oprogramowanie do analizy fragmentów. Powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, w tym kontroli dodatnich i ujemnych, przy użyciu elektroforezy kapilarnej. Jeśli problem nadal występuje, należy wymienić materiały eksploatacyjne używane w aparacie do elektroforezy kapilarnej. Aby znaleźć przyczynę źródłową błędu testu QC jakości wymiarowania, należy przeanalizować elektroferogram.

Objawy

Zaobserwowano słabą amplifikację lub nierównomierną intensywność pików alleli poszczególnych markerów kontrolnego DNA 2800M Control DNA (problem może dotyczyć również próbek).

Przyczyny i komentarze

Roztwór podstawowy kontrolnego DNA 2800M Control DNA lub rozcieńczony kontrolny DNA 2800M Control DNA nie zostały odpowiednio zmieszane w wytrząsarce. W takim przypadku można zaobserwować niskie lub nadmierne intensywności pików, w tym nadmierną amplifikację alleli markera Penta D. Należy wówczas powtórzyć reakcje amplifikacji oraz analizę metodą elektroforezy kapilarnej, uwzględniając również kontrolę dodatnią i ujemną.

Mieszanina do amplifikacji metodą PCR nie została odpowiednio zmieszana w wytrząsarce. Należy wówczas powtórzyć reakcje amplifikacji oraz analizę metodą elektroforezy kapilarnej, uwzględniając również kontrolę dodatnią i ujemną.

Rozcieńczony DNA 2800M Control DNA został przygotowany wcześniej i użyty ponownie. Należy przygotować świeże rozcieńczenie kontrolnego DNA 2800M Control DNA i powtórzyć reakcje amplifikacji oraz analizę metodą elektroforezy kapilarnej, używając świeżo przygotowanej próbki kontroli dodatniej i kontroli ujemnej.

Niskie wysokości pików zarejestrowane dla próbek zdrowej tkanki lub próbek tkanki guza. Możliwe niepowodzenie testu QC sygnału guza w przypadku próbek guza.

Niewystarczająca ilość matrycowego DNA. Niskie wysokości pików mogą utrudniać interpretację danych. Intensywności pików alleli obecnych w próbkach guza muszą być odpowiednio wysokie, aby umożliwić wykrywanie nowych alleli powyżej wartości progowej analizy (patrz część 6.3.10). Intensywności alleli obecnych w próbce zdrowej tkanki muszą być większe lub równe wartości progowej analizy. Należy się upewnić, że DNA został prawidłowo oznaczony ilościowo i rozcieńczony, i powtórzyć amplifikację przy użyciu 1,0 ng matrycowego DNA, jeśli wykryto błąd oznaczenia ilościowego. W przeciwnym wypadku należy powtórzyć amplifikację przy użyciu większej ilości DNA. Jeśli problem nadal występuje, należy powtórzyć oznaczenie przy użyciu DNA wyekstrahowanego z innego wycinka tkanki.

Objawy

Niskie wysokości pików zarejestrowane dla próbek zdrowej tkanki lub próbek tkanki guza. Możliwe niepowodzenie testu QC sygnału guza w przypadku próbek guza. (ciąg dalszy)

Przyczyny i komentarze

Zanieczyszczona matryca DNA. Zanieczyszczenie próbek DNA może utrudnić przeprowadzenie reakcji PCR. Aby znaleźć rozwiązanie problemu, należy zapoznać się instrukcjami producenta dotyczącymi wybranej metody ekstrakcji DNA. Jeśli wybrana metoda ekstrakcji nie zapewnia wystarczającej jakości DNA, konieczna może być zmiana metody. Podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System użyto DNA oczyszczonego i wyekstrahowanego z próbek tkanek CRC FFPE przy użyciu aparatu Maxwell® CSC Instrument oraz zestawu Maxwell® CSC FFPE DNA Kit. Inne metody mogą nie zapewniać takiej samej jakości DNA.

Niska jakość iniekcji podczas elektroforezy kapilarnej (problem dotyczy również pików standardu wielkości Size Standard 500). Należy powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, przy użyciu elektroforezy kapilarnej, uwzględniając również kontrolę dodatnią i ujemną.

Użyto formamidu o niskiej jakości. Należy używać wyłącznie Hi-Di™ 3500 Dx Series Formamide.

Wysokie stężenie soli lub zmieniony odczyn pH. Nie należy rozcieńczać matrycy DNA FFPE w buforach TE. Do rozcieńczania matrycowego DNA należy używać wyłącznie wody wolnej od nukleaz.

Problem z termocyklerem lub mikropłytką reakcyjną (problem dotyczy również reakcji kontroli dodatniej). Należy się upewnić, że reakcja PCR została poprawnie zaprogramowana, a wybrany termocykler spełnia kryteria dopuszczenia do użytkowania z systemem do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System (patrz część 3.5). Może być wymagana kalibracja bloku cieplnego. Należy używać wyłącznie mikropłetek MicroAmp®.

Objawy

Niskie wysokości pików zarejestrowane dla próbek zdrowej tkanki lub próbek tkanki guza. Możliwe niepowodzenie testu QC sygnału guza w przypadku próbek guza. (ciąg dalszy)

Przyczyny i komentarze

Próbki nie zostały poprawnie zdenaturowane przed elektroforezą kapilarną. Próbki należy denaturować metodą termiczną przez 3 minuty, a następnie schładzać na kruszonym lodzie lub w łaźni lodowej przez co najmniej 3 minuty bezpośrednio przed elektroforezą kapilarną.

DNA jest niskiej jakości lub uległ degradacji. Nieprawidłowe lub długotrwałe utrwalenie próbek w parafinie może skutkować niewielkim uzyskiem i niską jakością DNA. Nieprawidłowe przechowywanie DNA po skutecznej ekstrakcji również może spowodować jego degradację. W takim przypadku należy powtórzyć amplifikację, używając większej ilości DNA, lub ponownie wyekstrahować DNA z innego wycinka tkanki.

Składniki reakcji amplifikacji nie znajdowały się na dnie dołka podczas konfiguracji reakcji PCR. Przed rozpoczęciem cykli termicznych należy odwirować krótko mikropłytkę w wirówce minipłytkowej, tak aby zawartość dołków opadła na dno, co pozwoli również usunąć pęcherzyki powietrza.

Sygnał fluorescencyjny dla pików alleli przekroczył zakres dynamiczny wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej.

Zbyt duża ilość matrycowego DNA. Należy się upewnić, że DNA został prawidłowo oznaczony ilościowo i rozcieńczony. Jeśli stwierdzono błąd oznaczenia ilościowego, należy powtórzyć amplifikację przy użyciu 1,0 ng matrycowego DNA. W przeciwnym wypadku należy zastosować jedno z poniższych rozwiązań: 1) powtórzyć reakcję amplifikacji z użyciem mniejszej ilości DNA lub 2) rozcieńczyć produkty amplifikacji w mieszaninie elektroforetycznej w proporcji 1:8 (np. 1 µl produktów amplifikacji na 7 µl mieszaniny elektroforetycznej; patrz tabela 4, aby odpowiednio dobrać skład mieszaniny elektroforetycznej) i powtórzyć analizę metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem 1 µl rozcieńczonych produktów amplifikacji. Należy się upewnić, że metoda ekstrakcji DNA jest odpowiednia dla konkretnych próbek tkanek FFPE, a DNA przechowywano w sposób adekwatny do zastosowanej metody.

Objawy

Sygnal fluorescencyjny dla pików alleli przekroczył zakres dynamiczny wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej. (ciąg dalszy)

Przyczyny i komentarze

DNA z próbki tkanki FFPE uległ degradacji lub sieciowaniu. Zdegradowany lub usieciowany matrycowy DNA z próbki tkanki FFPE może wykazywać preferencyjną amplifikację mniejszych markerów, w szczególności NR-21. Należy zapewnić prawidłowe warunki przygotowywania próbek tkanek FFPE i przechowywania ekstraktów DNA z takich próbek. W przypadku próbek, których wyniki wykraczają poza skalę, można zastosować jedno z poniższych rozwiązań: 1) powtórzyć reakcję amplifikacji z użyciem mniejszej ilości DNA lub 2) rozcieńczyć produkty amplifikacji w mieszaninie elektroforetycznej w proporcji 1:8 (np. 1 µl produktów amplifikacji na 7 µl mieszaniny elektroforetycznej; patrz tabela 4, aby odpowiednio dobrać skład mieszaniny elektroforetycznej) i powtórzyć analizę metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem 1 µl rozcieńczonych produktów amplifikacji. Jeśli problem nadal występuje, należy powtórzyć amplifikację przy użyciu mniejszej ilości DNA. Może być konieczne ponowne przygotowanie DNA i powtórzenie analizy z użyciem innego wycinka tkanki.

Zaobserwowano nieprzewidziane piki dla co najmniej jednego koloru barwnika.

Piki satelitarne zostały mylnie uznane za allele mikrosatelitarne. W wyniku amplifikacji markerów mikrosatelitarnych powstają artefakty widoczne jako mniejsze piki rejestrowane dla fragmentów o 1 bp mniejszych lub większych niż wyraźne allele markerów powtórzeń mononukleotydów, lub o 1 bp albo 5 bp mniejszych lub większych niż allele markerów powtórzeń pentanukleotydów. Wysokości pików satelitarnych będą większe, jeśli użyto zbyt dużej ilości matrycowego DNA.

Zbyt duża ilość DNA. Należy użyć 1,0 ng matrycowego DNA. Amplifikacja matrycowego DNA w ilości > 4 ng może skutkować artefaktami o podniesionej linii odniesienia dla markera BAT-26 oraz większą liczbą pików satelitarnych.

Objawy

Zaobserwowano nieprzewidziane piki dla co najmniej jednego koloru barwnika. (ciąg dalszy)

Przyczyny i komentarze

Pik podciągnięty lub przeciek. Pik podciągnięty, nazywany również przeciekiem, może zostać zarejestrowany w przypadku zbyt dużych wysokości pików lub niskiej jakości kalibracji spektralnej. Należy powtórzyć kalibrację spektralną wybranego aparatu do elektroforezy kapilarnej. Należy się upewnić, że DNA został prawidłowo oznaczony ilościowo i rozcieńczony. Należy powtórzyć amplifikację przy użyciu 1,0 ng matrycowego DNA. Jeśli problem nadal występuje, należy powtórzyć amplifikację przy użyciu mniejszej ilości DNA.

Próbki nie zostały odpowiednio zdenaturowane przed załadowaniem. Próbkę należy denaturować metodą termiczną przez 3 minuty, a następnie schładzać na kruszonym lodzie lub w łaźni lodowej przez co najmniej 3 minuty bezpośrednio przed elektroforezą kapilarną.

Artefakty elektroforezy kapilarnej. Podczas elektroforezy kapilarnej mogą zostać zaobserwowane nieprawidłowe piki. Przed instalacją i użyciem należy się upewnić, że polimer został ogrzany do temperatury pokojowej. Powtórzyć iniekcję. Jeśli problem nadal występuje, należy powtórzyć amplifikację i analizę metodą elektroforezy kapilarnej.

Zanieczyszczenie kontroli lub próbki pobranej od pacjenta innym matrycowym DNA lub produktem amplifikacji. Zanieczyszczenie krzyżowe może stanowić problem. Należy używać pipet z końcówkami odpornymi na aerozole i regularnie zmieniać rękawiczki.

Niestabilna próbka guza podczas analizy została omyłko uznana za wzorcową próbkę zdrowej tkanki. Należy sprawdzić, czy próbki zostały prawidłowo zidentyfikowane i oznaczone. Próbkę, w przypadku których zaobserwowano problem, należy ponownie zamplifikować i przeanalizować metodą elektroforezy kapilarnej, aby potwierdzić prawdopodobną przyczynę źródłową problemu.

Objawy

Preferencyjna amplifikacja mniejszych markerów

Przyczyny i komentarze

DNA uległ sieciowaniu. DNA wyekstrahowany z próbek utrwalonych w parafinie często ulega sieciowaniu z innym DNA lub cząsteczkami białka, co uniemożliwia amplifikację dłuższych fragmentów DNA. W takim przypadku należy powtórzyć amplifikację z użyciem większej ilości DNA. Jeśli po użyciu większej ilości DNA obserwuje się saturację mniejszych markerów, należy powtórzyć ekstrakcję DNA i analizę próbek, używając innego wycinka tkanki. Jeśli problem nadal występuje, jakość próbki tkanki FFPE może być zbyt niska, aby można było przeprowadzić skuteczną analizę.

Zdegradowane DNA. Matryca DNA uległa degradacji do mniejszych fragmentów, a większe markery wykazują zmniejszony uzysk. Należy się upewnić, że kontrolny DNA 2800M Control DNA i próbki DNA FFPE przechowywano w odpowiednich warunkach. Należy powtórzyć reakcję amplifikacji z użyciem większej ilości DNA. Jeśli po użyciu większej ilości DNA obserwuje się saturację mniejszych markerów, należy powtórzyć ekstrakcję DNA i analizę próbek, używając innego wycinka tkanki. Jeśli problem nadal występuje, jakość próbki tkanki FFPE może być zbyt niska, aby można było przeprowadzić skuteczną analizę.

Niewystarczająca ilość matrycowego DNA. Należy się upewnić, że DNA został prawidłowo oznaczony ilościowo i rozcieńczony, a następnie powtórzyć amplifikację przy użyciu 1,0 ng matrycowego DNA, jeśli wykryto błąd oznaczenia ilościowego. Jeśli problem nadal występuje, należy ponownie przeprowadzić reakcję amplifikacji z użyciem większej ilości DNA lub ponownie wyekstrahować DNA z innego wycinka tkanki.

Objawy

W próbce guza nie stwierdzono obecności co najmniej jednego allelu pentanukleotydowego obecnego w próbce zdrowej tkanki

Przyczyny i komentarze

Próbki DNA ze zdrowej tkanki i tkanki guza pobrane od różnych osób zostały przeanalizowane jako para próbek pobranych od tej samej osoby. Należy się upewnić, że próbki zdrowej tkanki lub próbki tkanki guza zostały odpowiednio sparowane na mikropłytkę reakcyjnej PCR i podczas analizy metodą elektroforezy kapilarnej. Należy się upewnić, że próbki zostały odpowiednio oznaczone. Należy powtórzyć analizę próbek, których dotyczy problem, przy użyciu elektroforezy kapilarnej, upewniając się, że próbki zostały odpowiednio sparowane. Należy przy tym uwzględnić reakcje kontroli dodatniej i ujemnej. Jeśli problem nadal występuje, należy powtórzyć reakcje amplifikacji.

Próbka guza wykazuje utratę heterozygotyczności. Patrz część 6.5.3 i rysunek 13, aby uzyskać więcej informacji na temat interpretacji danych z takich próbek guza.

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. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer Version 3.2019.
20. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Uterine Neoplasm Version 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. Informacje dodatkowe

Informacje kontaktowe są dostępne na stronie internetowej **www.promega.com**; e-mail: **genetic@promega.com**

11.1 Załącznik A

Poniżej przedstawiono ustawienia kalibracji spektralnej użyte podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.

Poniższe ustawienia są odpowiednie do wykonania kalibracji spektralnej przy użyciu analizatorów genetycznych Applied Biosystems® 3500 Series:

Dye set template (Szablon zestawu barwników): AnyDye (Dowolny barwnik) (3500 Series)

Dye order (Kolejność barwników): 5, blue (niebieski); 4, green (zielony); 3, yellow (żółty); 2, red (czerwony); 1, orange (pomarańczowy) (purple (fioletowy) niezaznaczony)

Matrix Condition Number Upper Limit (Górny limit liczby warunków dla matrycy): 8,0

Locate Start Point After Scan (Lokalizacja punktu startowego po skanowaniu): 300

Locate Start Point Before Scan (Lokalizacja punktu startowego przed skanowaniem): 5000

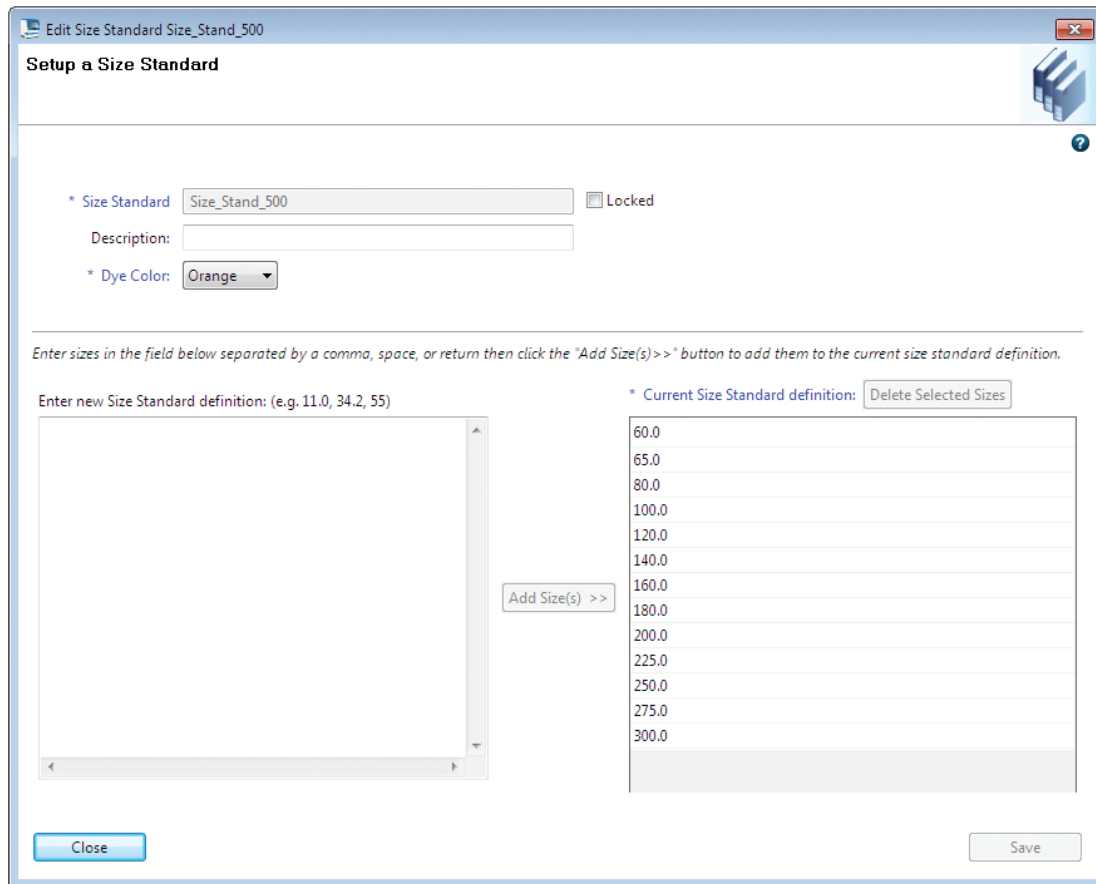
Limit Scans To (Ograniczenie skanów do): 6500

Sensitivity (Czułość): 0,4

Minimum Quality Score (Minimalna wartość jakości): 0,95

11.2 Załącznik B

Poniżej przedstawiono ustawienia analizy fragmentów użyte podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System przy użyciu analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.



16190TA

Rysunek 14. Definiowanie parametru Size Standard (Standard wielkości) aparatu do elektroforezy kapilarnej.

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:

Rysunek 15. Ustawienia funkcji Instrument Protocol (Protokół aparatu) aparatu do elektroforezy kapilarnej.

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:

	Blue	Green	Yellow	Red	Purple	Orange
Minimum Peak Height	☒ 175	☒ 175	☒ 175	☒ 175	☐ 175	☒ 175

Common Settings

Use Smoothing:

Use Baseline (Baseline Window (Pts)) ☒

Minimum Peak Half Width

Peak Window Size

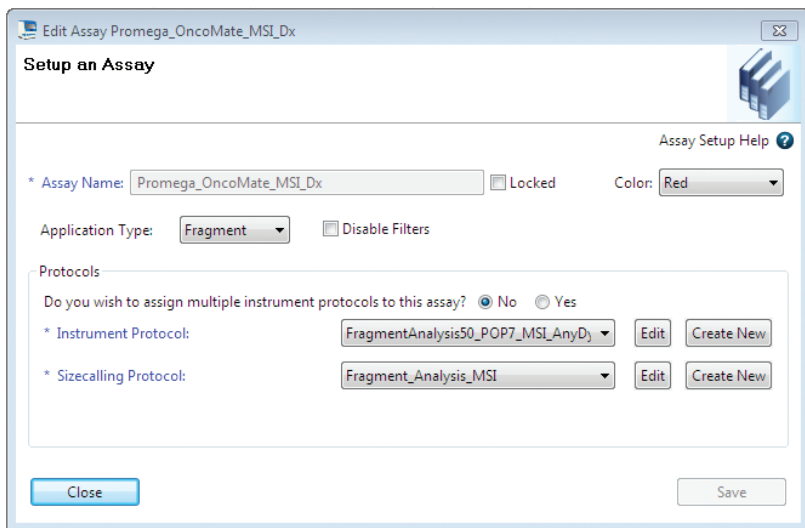
Polynomial Degree

Slope Threshold Peak Start

Slope Threshold Peak End

16192TA

Rysunek 16. Ustawienia funkcji Sizecalling Protocol (Protokół określania wielkości) aparatu do elektroforezy kapilarnej.



16193TA

Rysunek 17. Ustawienia funkcji Assay (Oznaczenie) aparatu do elektroforezy kapilarnej.

11.3 Załącznik C

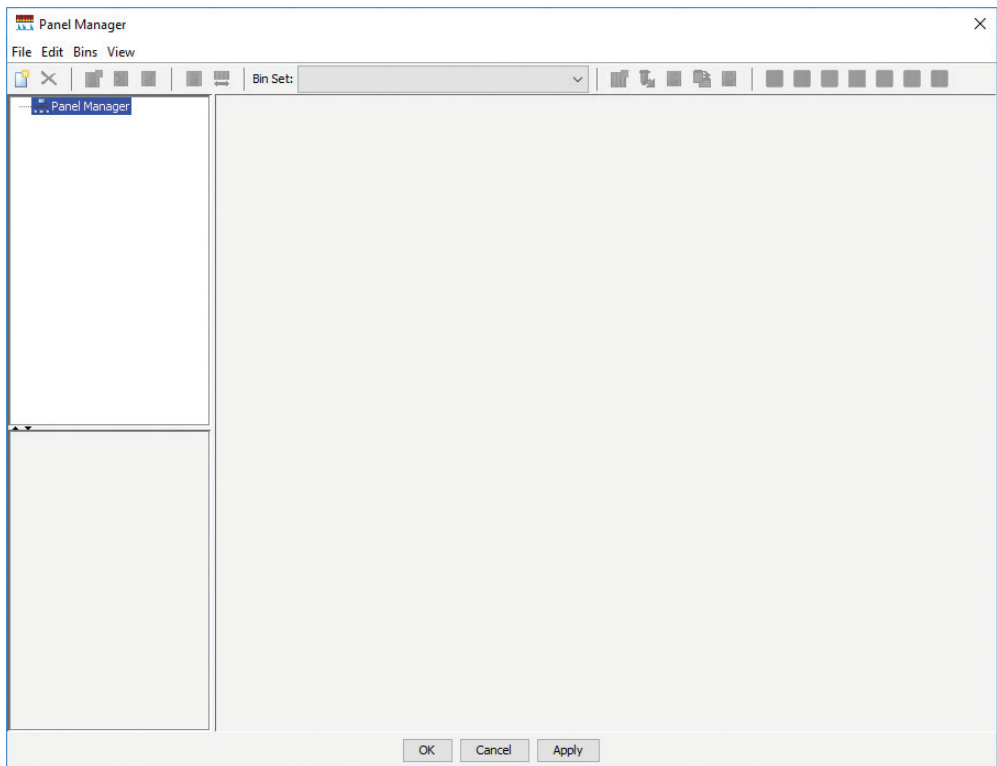
Ustawienia analizy danych oprogramowania GeneMapper® 5.0 użyte w trakcie oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Uwaga: Nazwy plików ustawień oprogramowania GeneMapper® oraz instrukcje analizy podano dla wygody użytkownika i odnoszą się one wyłącznie do danych z elektroforezy kapilarnej wygenerowanych przy użyciu zestawu kapilar 50 cm i polimeru POP-7® Polymer. Użytkownicy, którzy do analizy produktów zamplikowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System używają innych konfiguracji aparatu do elektroforezy kapilarnej, muszą sprawdzić, czy instrukcje analizy danych odpowiadają konkretnej stosowanej przez nich konfiguracji. W przypadku niektórych konfiguracji aparatu korzystniejsze może być zastosowanie metod analizy utworzonych przez użytkownika.

Importowanie plików ustawień do oprogramowania GeneMapper

Aby ułatwić analizę danych wygenerowanych przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System, utworzono pliki (Panels (Panele), Analysis Method (Metoda analizy), Size Standard (Standard wielkości), Plot Settings (Ustawienia wykresu), Table Settings (Ustawienia tabeli) i Report Settings (Ustawienia raportu)) do zaimportowania do oprogramowania GeneMapper® Software w wersji 5.0 i 6.0. Można je pobrać ze strony internetowej firmy Promega pod adresem: www.promega.com/OncomatePanels. Ponadto poniżej podano definicje parametrów Panels (Panele), Size Standard (Standard wielkości) i Analysis Method (Metoda analizy) (tabele 9 i 10, rysunek 19). Dodatkowe informacje można znaleźć w dokumentacji technicznej oprogramowania GeneMapper® Software w wersji 5.0 i 6.0.

1. Otworzyć program GeneMapper® Software w wersji 5.0 lub 6.0.
2. Wybrać pozycję **Tools (Narzędzia)**, a następnie pozycję **Panel Manager (Menedżer panelu)**.
3. Wybrać pozycję **Panel Manager (Menedżer panelu)** w lewym górnym panelu (rysunek 18).
4. Rozwinąć menu **File (Plik)** i wybrać opcję **Import Panels (Importuj panele)**. Aby opcja **Import Panels (Importuj panele)** była dostępna do wyboru, ikona Menedżera panelu musi być zaznaczona (podświetlona na niebiesko).
5. Przejsć do lokalizacji w komputerze użytkownika, w której zapisano plik tekstowy paneli. Wybrać plik **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** i kliknąć przycisk **Import (Importuj)**.
6. W dolnej części okna Panel Manager (Menedżer panelu) wybrać opcję **Apply (Zastosuj)**, a następnie kliknąć przycisk **OK**.
7. Wybrać pozycję **Tools (Narzędzia)**, a następnie pozycję **GeneMapper Manager (Menedżer GeneMapper)**.
8. Wybrać zakładkę **Size Standard (Standard wielkości)**, a następnie kliknąć przycisk **Import (Importuj)** w dolnej części okna GeneMapper Manager (Menedżer GeneMapper).
9. Przejsć do lokalizacji w komputerze użytkownika, w której zapisano plik Size Standard (Standard wielkości). Wybrać plik **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0**, a następnie kliknąć przycisk **Import (Importuj)**.
10. Pozostawiając okno GeneMapper Manager (Menedżer GeneMapper) otwarte, powtórzyć czynności opisane w krokach 8 i 9, aby zaimportować pozostałe pliki ustawień (Analysis Method (Metoda analizy), Plot Settings (Ustawienia wykresu), Table Settings (Ustawienia tabeli) i Report Settings (Ustawienia raportu)).
11. Po zaimportowaniu wszystkich plików ustawień, kliknąć przycisk **Done (Gotowe)** w dolnej części okna GeneMapper Manager (Menedżer GeneMapper).



Rysunek 18. Okno Panel Manager (Menadżer panelu) oprogramowania GeneMapper® z zaznaczoną ikoną Panel Manager (Menedżer panelu). Opcja Import Panels (Importuj panele) (krok 4) jest dostępna w menu File (Plik), gdy ikona Panel Manager (Menedżer panelu) jest zaznaczona (podświetlona na niebiesko).

Tabela 9. Zdefiniowane wartości parametru Marker Panel (Panel markerów).

Marker	Kanał barwnika	Zakres panelu (w bp) ¹		Typ powtórzeń ²
		Od	Do	
BAT-26	niebieski	83	121	1
Penta D	niebieski	123	253	5
NR-21	zielony	83	108	1
BAT-25	zielony	110	132	1
MONO-27	zielony	134	168	1
NR-24	żółty	103	138	1
Penta C	żółty	140	228	5

¹Oczekiwany zakres wielkości amplikonów dla poszczególnych markerów musi zostać zdefiniowany w wybranym oprogramowaniu do analizy fragmentów.

²Typ mikrosatelity w niniejszej tabeli zdefiniowano jako 1 (w przypadku markerów powtórzeń mononukleotydów) lub 5 (w przypadku markerów powtórzeń pentanukleotydów).

Tabela 10. Zdefiniowane wartości parametru Size Standard (Standard wielkości). Standard wielkości Size Standard 500 umożliwia rejestrację pików fragmentów w zakresie od 60 bp do 500 bp, choć analiza pików fragmentów w zakresie od 60 bp do 300 bp jest wystarczająca do wymiarowania fragmentów przy użyciu systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Nr fragmentu standardu wielkości	Wielkość fragmentu (w 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

Analysis Method Editor - Microsatellite

General | **Allele** | Peak Detector | Peak Quality | Quality Flags

Bin Set: **None**

Marker Repeat Type

☐ Use marker-specific stutter ratio if available

Values for dinucleotide repeats are calculated automatically.

	Mono	Tri	Tetra	Penta	Hexa
Cut-off value	0.036	0.0	0.0	0.1	0.0
PlusA ratio	.9999	0.0	0.0	0.3	0.0
PlusA distance	50.0	0.0	0.0	1.6	0.0
Stutter ratio	.9999	0.0	0.0	0.3	0.0
Stutter distance	From 0.0 To 1.5	0.0	0.0	0.0	0.0

Range Filter... Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General | Allele | **Peak Detector** | Peak Quality | Quality Flags

Peak Detection Algorithm: **Advanced**

Ranges

Analysis: **Full Range** Sizing: **All Sizes**

Start Pt: 300 Start Size: 50

Stop Pt: 10000 Stop Size: 1000

Smoothing and Baseline

Smoothing: ☒ None ☐ Light ☐ Heavy

Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

☐ 2nd Order Least Squares

☐ 3rd Order Least Squares

☐ Cubic Spline Interpolation

☒ Local Southern Method

☐ Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:

B: 175 R: 175

G: 175 P: 175

Y: 175 O: 175

Min. Peak Half Width: 2 pts

Polynomial Degree: 3

Peak Window Size: 11 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0

Peak End: 0.0

Size Standard Normalization

☐ Enable Normalization

Note: For 35XX series data collection normalization only.

Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General | Allele | Peak Detector | **Peak Quality** | Quality Flags

Signal level

Homozygous min peak height: 200.0

Heterozygous min peak height: 100.0

Heterozygote balance

Min peak height ratio: 0.5

Peak morphology

Max peak width (basepairs): 0.75

Pull-up peak

Pull-up ratio: 0.1

Pull-up scan: 1

Allele number

Max expected alleles: 2

Cross-talk peak

Cross-talk ratio: 0.05

Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General | Allele | Peak Detector | Peak Quality | **Quality Flags**

Quality weights are between 0 and 1.

Quality Flag Settings

Spectral Pull-up (SPU)	0.5	Control Concordance (CC)	0.5
Broad Peak (BP)	0.5	Low Peak Height (LPH)	0.5
Single Peak Artifact (SPA)	0.5	Off-scale (OS)	0.5
Sharp Peak (SHP)	0.5	Peak Height Ratio (PHR)	0.5
Cross Talk (XTLK)	0.5	One Basepair Allele (OBA)	0.5
Out of Bin Allele (BIN)	0.8	Split Peak (SP)	0.5

PQV Thresholds

Pass Range: **From 0.75 to 1.0**

Low Quality Range: **From 0.0 to 0.25**

Sizing Quality: **From 0.75 to 1.0**

Genotype Quality: **From 0.75 to 1.0**

Assume Linearity From (bp): 0 To (bp): 800

Factory Defaults

OK Cancel

Rysunek 19. Ustawienia analizy użyte podczas oceny wiarygodności systemu do analizy OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

^(a)Amerykańska publikacja patentowa nr 9,139,868, europejska publikacja patentowa nr 2972229 oraz inne zgłoszone wnioski patentowe.

^(b)Barwniki TMR-ET, CXR-ET i WEN to produkty chronione patentem.

© 2019 Promega Corporation. Wszelkie prawa zastrzeżone.

GoTaq i Maxwell to zastrzeżone znaki towarowe firmy Promega Corporation. OncoMate jest znakiem towarowym firmy Promega Corporation.

Applied Biosystems, GeneMapper i Veriti to zastrzeżone znaki towarowe firmy Applied Biosystems. MasterCycler jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy Eppendorf. Hi-Di jest znakiem towarowym firmy Applera Corporation. C1000 Touch jest znakiem towarowym firmy Bio-Rad Laboratories, Inc. MicroAmp i POP-7 to zastrzeżone znaki towarowe firmy Thermo Fisher Scientific.

Produkty mogą być przedmiotem zgłoszonych bądź przyznanych patentów lub mogą podlegać pewnym ograniczeniom. Więcej informacji można znaleźć na naszej stronie internetowej. Wszystkie ceny i dane techniczne mogą ulec zmianie bez wcześniejszego powiadomienia.

Oświadczenia dotyczące produktów mogą ulec zmianie. Aby uzyskać aktualne informacje na temat produktów firmy Promega, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Promega lub zapoznać się z katalogiem produktów firmy Promega dostępnym w Internecie.