

MANUEL TECHNIQUE

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Mode d'emploi du produit

MD3140



MODES D'EMPLOI
DU PRODUIT

MD3140



Rév 0
TM595



PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1.	Introduction	3
1.1	Présentation du OncoMate™ MSI Dx Analysis System	3
1.2	Nom du produit.....	4
1.3	Abréviations et définitions.....	5
1.4	Légende des symboles utilisés	6
1.5	Utilisation prévue	7
1.6	Informations contextuelles	8
1.7	Principe du test	9
2.	Composants du produit et conditions de stockage	12
2.1	Éléments fournis avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System (réf. cat. MD3140).....	12
2.2	Stockage et manutention du OncoMate™ MSI Dx Analysis System	13
2.3	Éléments non fournis.....	13
3.	Avant de commencer	14
3.1	Avertissements et précautions.....	14
3.2	Exigences relatives aux échantillons	15
3.3	Méthodes d'extraction de l'ADN et exigences relatives à la qualité de l'ADN	15
3.4	Exigences relatives à la quantité d'ADN	15
3.5	Exigences relatives au thermocycleur	16
3.6	Exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire	16
3.7	Exigences relatives à la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire.....	17
3.8	Exigences relatives au logiciel d'analyse des données	17
3.9	Exigences relatives au seuil d'analyse	17
4.	Protocole de test	18
4.1	Dilution des extraits FFPE d'ADN tissulaire	18
4.2	Dilution du 2800M Control DNA	19
4.3	Préparation des réactions d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.....	20
4.4	Thermocyclage	21
4.5	Préparation de l'appareil d'électrophorèse capillaire	22
4.6	Préparation des fragments amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System pour l'électrophorèse capillaire	22
4.7	Détection de fragments amplifiés par électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence	23
5.	Analyse des données.....	23
5.1	Introduction	23
5.2	Analyser les données.....	25

6.	Examen et interprétation des résultats	26
6.1	Comprendre les données du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.....	27
6.2	Résumé des artefacts d'amplification connus et des anomalies d'électrophorèse capillaire	29
6.3	Exigences en matière de contrôle de la qualité pour l'interprétation des données	30
6.4	Détermination de la stabilité des marqueurs de répétition de mononucleotides	38
6.5	Interprétation du statut MSI d'une tumeur	40
7.	Contrôles de la qualité des tests.....	45
7.1	Calibration spectrale.....	45
7.2	Échantillon de tissu normal apparié	45
7.3	Contrôles positifs et négatifs.....	45
7.4	Étalons d'électrophorèse capillaire.....	46
7.5	Seuil d'analyse.....	46
8.	Limites spécifiques	47
9.	Dépannage	48
10.	Bibliographie.....	54
11.	Informations supplémentaires	56
11.1	Annexe A	56
11.2	Annexe B	57
11.3	Annexe C	61

1. Introduction

1.1 Présentation du OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Ce guide décrit le OncoMate™ MSI Dx Analysis System et constitue la principale source d'informations sur son utilisation prévue, ses composants, ses limites, son protocole, son dépannage et plus encore. Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System est un dispositif médical de diagnostic in vitro bénéficiant du marquage CE, qui utilise l'analyse basée sur la PCR par fluorescence dans le cadre d'un travail de laboratoire plus large (schéma 1) pour analyser des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) pour détecter une instabilité des microsatellites (MSI). Il convient d'utiliser la matrice étalon OncoMate™ 5C (réf. cat. MD3850) pour l'analyse par électrophorèse capillaire des produits amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Les consignes d'utilisation de la matrice étalon OncoMate™ 5C sont fournies dans le manuel technique *Matrice étalon OncoMate™ 5C Matrix* no.TM597.

L'intégralité du processus relatif à l'utilisation du OncoMate™ MSI Dx Analysis System comprend : l'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon de tissu FFPE, la quantification de l'ADN, l'amplification de marqueurs microsatellites spécifiques par PCR multiplex, l'analyse de fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse capillaire et l'analyse des données de fragments d'électrophorèse capillaire à l'aide d'un logiciel d'analyse de fragments. Les utilisateurs du OncoMate™ MSI Dx Analysis System doivent choisir les composantes de travail appropriées d'après les exigences énoncées à la section 3. Pour plus d'informations, consulter la documentation technique sur la méthode d'extraction de l'ADN, la méthode de quantification de l'ADN, le thermocycleur, l'appareil d'électrophorèse capillaire et le logiciel d'analyse de fragments qui ont été sélectionnés.



Isoler l'ADN.



Quantifier l'ADN.

Réactifs fluorescents ou appareils (ou les deux) pour quantification de l'ADN (voir la section 1.7)



Amplifier l'ADN.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System (réf. cat. MD3140, TM595)
Vitesse du thermocycleur 3,9–5°C/seconde



Calibrer le spectre des colorants.

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



Séparer et détecter.

Analyseur génétique Applied Biosystem® 3500 Dx
ou appareil d'électrophorèse capillaire comparable



Analyser et interpréter les données.

Logiciel d'analyse de fragments

Schéma 1. Processus de laboratoire associé au OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1.2 Nom du produit

Système d'analyse OncoMate™ MSI Dx

Réf. cat. MD3140, 100 réactions



152077B

1.3 Abréviations et définitions

bp, paire de base

CCR, cancer colorectal

DCS, logiciel de collecte de données

dMMR, déficience du système de réparation des mésappariements

ADNdb, ADN double brin

ESMO, Société européenne d'oncologie médicale

FFPE, fixé au formol et inclus en paraffine

HNPCC, cancer colorectal héréditaire sans polypose

ICI, inhibiteur des points de contrôle immunitaires

LOH, perte d'hétérozygotie

MMR, réparation des mésappariements

MSI, instabilité des microsatellites

MSI-H, instabilité des microsatellites élevée : résultat interprétatif d'un échantillon lorsque deux marqueurs ou plus sont instables.

MSS, microsatellites stables : résultat interprétatif d'un échantillon lorsque moins de deux marqueurs sont instables.

PCR, amplification en chaîne par polymérase

RFU, unités de fluorescence relative

CQ, contrôle de la qualité

NA, non applicable

Allèle : Une parmi deux formes (p. ex., longueur) – ou plus – d'un marqueur d'ADN.

Infiltration : artefact d'électrophorèse capillaire où les pics d'un canal de fluorochrome sont détectés dans un deuxième canal de fluorochrome à environ la même taille (bp) ; phénomène également appelé « interférence spectrale ».

Marqueur d'ADN : séquence d'intérêt dans le génome.

Hétérozygote : les allèles d'un marqueur d'ADN sont de formes différentes.

Homozygote : les deux allèles d'un marqueur d'ADN ont la même forme.

Répétition mononucléotidique : Structure d'ADN dans laquelle la même base nucléotidique est répétée.

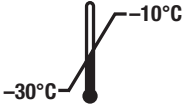
Quasi-monomorphe : marqueur d'ADN pour lequel la plupart des patients sont homozygotes pour le même allèle commun.

Stable : le changement de la taille des allèles indique l'absence d'une déficience du système de réparation des mésappariements.

Pic de glissement : artefact de PCR résultant du glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication in vitro. Les pics de glissement sont une ou plusieurs unités répétées, plus courtes ou plus longues que le pic réel de l'allèle.

Instable : le changement de la taille des allèles indique une déficience du système de réparation des mésappariements.

1.4 Légende des symboles utilisés

Symbole	Explication	Symbole	Explication
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Représentant agréé
	Stocker entre -30 °C et -10 °C		Fabricant
	Conformité européenne		Irritant
	Référence du catalogue		Numéro de lot
	Ne pas réutiliser		Contenu suffisant pour <n> tests
	Utiliser avant le		Tenir à l'abri de la lumière
	Consulter le mode d'emploi		

1.5 Utilisation prévue

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System est un test pour l'attribution des tailles des fragments par PCR servant à déterminer le statut MSI (instabilité des microsatellites) dans un ADN purifié provenant d'échantillons de tissus humains fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) dérivés de tumeurs solides.

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System génère des profils alléliques à partir d'échantillons de tissus FFPE tumoraux et non tumoraux prélevés sur un même patient, par le biais de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) des marqueurs microsatellites de l'ADN, suivi de la séparation par électrophorèse capillaire des marqueurs amplifiés. On détermine le statut MSI en comparant les profils alléliques. Une expansion ou une réduction de la longueur des séquences d'ADN répétitives dans l'ADN des cellules tumorales par rapport à l'ADN des cellules normales d'un même patient indique une MSI. Les tissus normaux et tumoraux d'un même patient doivent être testés en même temps et les données des deux échantillons doivent être disponibles pour comparaison afin que les résultats soient valables.

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System n'a pas pour objet de diagnostiquer une maladie en particulier. Il est destiné aux patients à qui l'on a déjà diagnostiqué un cancer et qui pourraient bénéficier de tests génétiques supplémentaires. Les résultats des tests obtenus à l'aide de ce produit doivent être interprétés par un professionnel de santé, en prenant en compte les autres résultats cliniques, les antécédents familiaux et les données de laboratoire. Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement.

1.6 Informations contextuelles

Les microsatellites sont des séquences d'ADN courtes et répétitives constituées d'unités répétitives comprenant un à six nucléotides [par ex. (A)_n, (CA)_n, (AAAAG)_n]. Les séquences microsatellites sont réparties dans tout le génome humain et sont sujettes à des erreurs d'insertion et de suppression pendant la réplication de l'ADN. Normalement, le système de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN cellulaire répare les erreurs. On observe une instabilité des microsatellites lorsque le système MMR est déficient et qu'il ne répare pas les erreurs de réplication de l'ADN, ce qui occasionne des longueurs d'allèles microsatellites différentes dans le tissu qui présente une déficience du système MMR comparé aux échantillons de tissus normal (Bacher, 2004 ; Boland, 2010 ; Ionov, 1993 ; Umar, 2004 ; Wang, 2017). Parmi les microsatellites, les répétitions de mononucléotides sont les plus susceptibles de présenter une instabilité (Bacher, 2004 ; Ionov, 1993). L'instabilité des microsatellites peut résulter de plusieurs mécanismes sous-jacents, y compris la mutation somatique et germinale des gènes MMR et l'altération des régions promotrices des gènes MMR. Chez les personnes présentant une déficience du système MMR, l'accumulation de mutations peut provoquer un dysfonctionnement cellulaire et, au final, un cancer. (Boland, 2010 ; Le, 2015 ; Timmermann, 2010).

Il y existe une forte corrélation entre l'instabilité des microsatellites et le syndrome de Lynch. Le syndrome de Lynch est une maladie autosomique dominante résultant de mutations germinales dans l'un des quatre principaux gènes MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) qui prédispose au cancer. Identifier les personnes atteintes du syndrome de Lynch permet de détecter le cancer de manière précoce et d'intervenir à un stade de la maladie où la survie peut être plus facilement assurée. Au niveau du génome, une défaillance d'un gène MMR entraîne une perte d'expression ou de fonction de la protéine MMR correspondante. L'instabilité des microsatellites provient de la déficience du système MMR et, par conséquent, informe, avec les antécédents cliniques et familiaux, d'une susceptibilité génétique sous-jacente. Les cancers les plus couramment associés au syndrome de Lynch sont, entre autres, les cancers colorectaux et endométriaux. Toutefois, le syndrome de Lynch a été identifié dans pratiquement tous les types de tumeurs solides. (Cortes-Ciriano, 2018 ; Hause, 2016 ; Latham, 2018). Plusieurs associations d'oncologie sont favorables au dépistage universel des cancers colorectaux et endométriaux par test MSI afin d'identifier les candidats susceptibles de bénéficier de tests génétiques supplémentaires pour détecter le syndrome de Lynch, notamment la Société européenne d'oncologie médicale (ESMO ; Stjepanovic, 2019), le National Comprehensive Cancer Network (CRC, EC), et la Société américaine d'oncologie clinique (Sepulveda, 2017 ; Stoffel, 2015).

Plus récemment, l'instabilité des microsatellites a été associée à la réponse aux traitements appelés « inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (ICI) » (Le, 2015 ; Overman, 2017). Les traitements ICI ciblent les récepteurs immunosuppresseurs ou leurs ligands et, avec le traitement, les cellules immunitaires du patient sont plus aptes à combattre le cancer. En raison du déficit du système MMR de l'ADN, les tumeurs caractérisées par une instabilité des microsatellites élevée (MSI-H) sont hypermutées et produisent davantage de néoantigènes ou de nouveaux épitopes, dont certains sont considérés comme immunogènes et déclenchent une réponse immunitaire contre le cancer (Le, 2017). En conséquence, les tumeurs MSI-H présentent souvent une antigénicité et montrent plus d'infiltration lymphocytaire, scénario dans lequel le patient est susceptible de répondre à un traitement ICI. L'identification des patients pouvant bénéficier de ces traitements apporte des options et des renseignements supplémentaires aux professionnels de santé. Une instabilité des microsatellites a été observée dans de nombreux types de tumeurs (Cortes-Ciriano, 2018 ; Hause, 2016 ; Latham, 2018) et la réponse au traitement ICI a été démontrée sur un ensemble de tumeurs MSI-H issues de divers sites d'origine. (Le, 2015). La Société européenne d'oncologie médicale (ESMO) a reconnu l'importance des tests MSI et tests de déficience du système de réparation des mésappariements pour déterminer l'admissibilité des patients aux traitements ICI, et a résumé ses recommandations concernant l'utilisation de tests MSI à ces fins (Luchini, 2019, Stjepanovic, 2019). Le groupe de travail sur la recherche translationnelle et la médecine de précision de l'ESMO recommande le test MSI sur les tumeurs correspondant au spectre du syndrome de Lynch, en raison de l'utilité potentielle du traitement ICI sur ces cancers et parce que l'identification du syndrome de Lynch peut profiter aux membres de la famille élargie. Il est recommandé d'utiliser conjointement le test MSI par PCR et l'analyse par IHC du statut dMMR car, par le passé, il a été signalé un taux élevé de faux positifs provenant de tests élaborés par des laboratoires locaux. Enfin, le comité recommande des panels de cinq marqueurs de répétition de mononucléotides en raison de leur plus grande sensibilité et spécificité par rapport aux panels comprenant des marqueurs de répétition de dinucléotides (Luchini, 2019).

1.7 Principe du test

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System est un test PCR multiplex par fluorescence servant à détecter les changements de longueur de séquence d'ADN dans les régions microsatellites de l'ADN tumoral par rapport aux mêmes régions de l'ADN des cellules normales du patient. Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System cible sept marqueurs microsatellites : cinq marqueurs de répétition de mononucléotides (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et MONO-27) et deux marqueurs de répétition de pentanucléotides (Penta C et Penta D ; tableau 1, schéma 2). On analyse ces marqueurs de répétition de mononucléotides pour déterminer le statut MSI ; ils ont été sélectionnés pour leur haute sensibilité et leur spécificité aux altérations des longueurs répétitives dans les échantillons présentant des erreurs de réparation des mésappariements. Pour chacun des cinq marqueurs de répétition de mononucléotides, on compare la ou les tailles des allèles (en paire de base, bp) de l'échantillon tumoral avec l'échantillon normal pour déterminer la présence d'un nouvel allèle représentatif d'une MSI (schéma 3). On interprète un marqueur comme étant instable lorsque l'on détecte un nouvel allèle dont la taille diffère d'au moins 2,75 pb (3 bases moins 0,25 paire de base pour tenir compte de la précision de mesure de l'électrophorèse capillaire) par rapport à l'allèle de référence de l'échantillon normal. Un échantillon tumoral est considéré comme MSI-H lorsque deux marqueurs ou plus sont interprétés comme instables. Un échantillon tumoral est considéré comme MSS lorsque moins de deux marqueurs sont interprétés comme étant instables (Hampel, 2008; Boland, 1998). Bien que ces marqueurs soient quasi-monomorphiques (c.-à-d. que la plupart des individus sont homozygotes pour les mêmes allèles communs) et les tissus normaux présentent généralement une distribution unique des pics à chaque marqueur mononucléotidique, une hétérozygotie de basse fréquence ou une variation de la longueur de l'allèle du tissu normal entre les individus a été observée. En raison de la possibilité d'hétérozygotie, les données provenant d'échantillons appariés de tissu normal et de tissu tumoral CCR doivent être interprétées ensemble pour déterminer le statut MSI de la tumeur. Deux marqueurs de répétition de pentanucléotides sont analysés pour confirmer l'identité entre les échantillons d'ADN normal et tumoral et ils ont été sélectionnés pour leur haut niveau de polymorphisme et leur faible degré de MSI (Bacher, 2004). Lorsque tous les allèles détectés dans l'échantillon normal sont également présents dans l'échantillon tumoral, l'identité de l'échantillon est confirmée.

Tableau 1. Plages de tailles amplifiées et canaux de détection prévus pour les marqueurs inclus dans le kit d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Les plages correspondent aux tailles attendues pour des données générées à l'aide d'un polymère POP-7® et d'un réseau capillaire de 50 cm.

Marqueurs mononucléotidiques	Structure de répétition	Canal de détection	Plage de tailles amplifiées
BAT-26	A ₍₂₆₎	Bleu	83–121 bp
NR-21	A ₍₂₁₎	Vert	83–108 bp
BAT-25	A ₍₂₅₎	Vert	110–132 bp
MONO-27	A ₍₂₇₎	Vert	134–168 bp
NR-24	A ₍₂₄₎	Jaune (affiché en noir)	103–138 bp
Marqueurs pentanucléotides	Structure de répétition	Canal de détection	Plage de tailles amplifiées
Penta D	AAAGA _(2–17)	Bleu	123–253 bp
Penta C	AAAAC _(4–17)	Jaune (affiché en noir)	140–228 bp

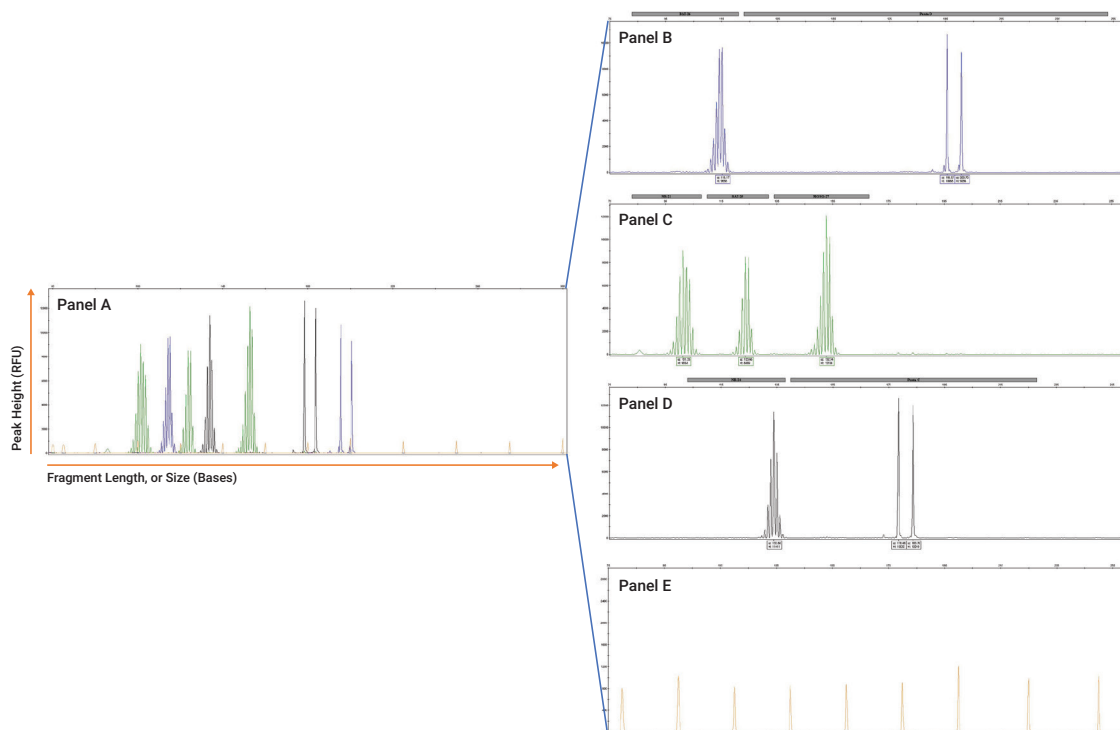
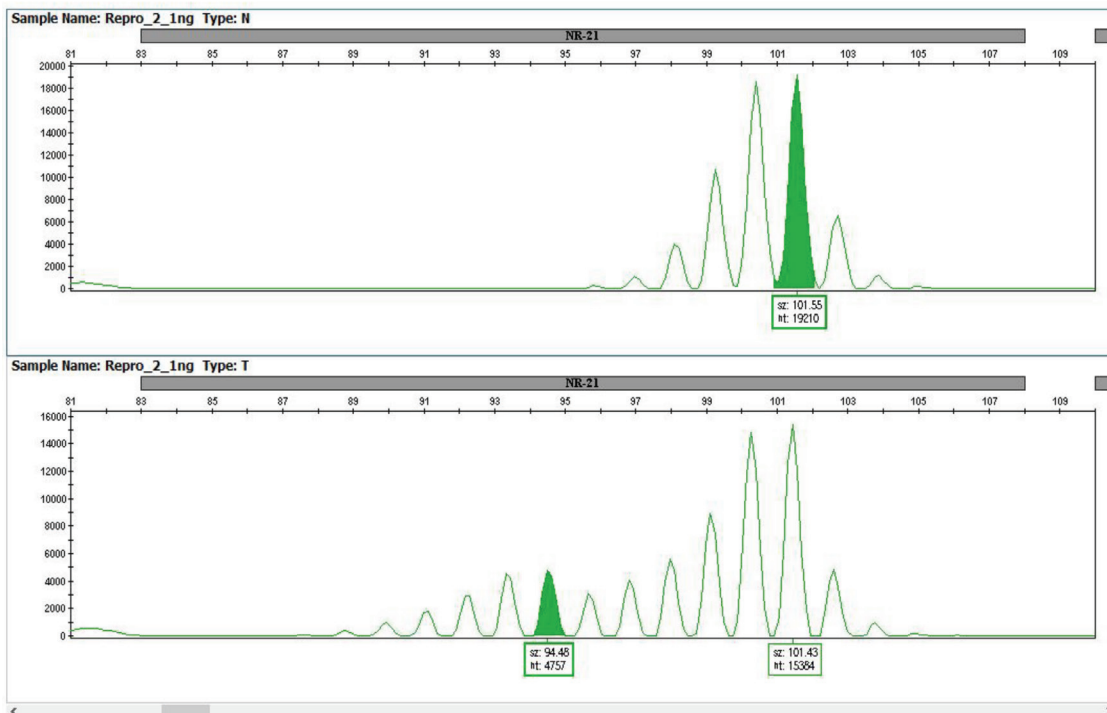


Schéma 2. Exemple de données du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Une matrice unique d'ADN génomique (1 ng) a été amplifiée avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System et les produits de PCR ont été analysés à l'aide de l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx avec un polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm. **Panel A.** Électrophorégramme montrant la détection simultanée de tous les fragments d'ADN marqués par fluorescence. **Panels B–E.** Données microsatellites affichées par canal de détection pour faciliter l'interprétation. Le panel E illustre les pics de fragment de l'étalon de taille Size Standard 500.



16114TA

Schéma 3. Évaluation de la stabilité des marqueurs mononucléotidiques. Dans l'exemple ci-dessus, les allèles microsatellites d'intérêt sont mis en évidence. Pour un marqueur mononucléotidique, si la taille du nouvel allèle de l'échantillon tumoral varie de celle de l'allèle de référence de l'échantillon normal d'au moins 2,75 pb, le marqueur est interprété comme instable. Dans cet exemple, l'allèle de référence de l'échantillon normal (électrophorégramme du haut) est de 101,55 pb, tandis que le nouvel allèle de l'échantillon tumoral (électrophorégramme du bas) est de 94,48 pb. La différence de taille entre ces deux allèles est de 7,07 pb ; cette différence est $\geq 2,75$ pb, donc le marqueur NR-21 est interprété comme instable.

En utilisant la PCR multiplex avec des amorces marquées par des fluorochromes, les sept régions microsatellites sont amplifiées dans la même réaction pour générer des produits de PCR marqués par des fluorochromes. On ajoute ensuite les produits de PCR et un étalon de taille marqué par fluorescence, l'étalon de taille Size Standard 500, au formamide et on les dénature par la chaleur. L'ADN monocaténaire ainsi obtenu est injecté de manière électrocinétique dans un appareil d'électrophorèse capillaire, où les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille et détectés par le marqueur fluorescent incorporé. L'analyse de l'étalon de taille avec les fragments d'ADN microsatellites permet d'attribuer des tailles précises et de faire des comparaisons de taille directes entre les échantillons. Après l'électrophorèse capillaire, les fichiers de données des fragments d'ADN (.fsa) générés par l'appareil peuvent être analysés à l'aide d'un logiciel d'analyse de fragments pour déterminer leur taille et identifier les allèles.

2. Composants du produit et conditions de stockage

2.1 Éléments fournis avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System (réf. cat. MD3140)

 Ce produit contient suffisamment de réactifs pour effectuer 100 réactions (50 réactions couplées).

Les éléments suivants sont fournis :

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	200 µl	MD705A

Comprend : Amorce marquée au fluorochrome et amorce non marquée pour BAT-26, Penta D, NR-21, BAT-25, MONO-27, NR-24 et Penta C dans une solution tampon.

 **Conditions de stockage :** Zone de préamplification ; Tenir à l'abri de la lumière.

Diagramme de température : -30°C → -10°C (avant utilisation) ; 2°C → 10°C (après la première utilisation).

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
Master Mix OncoMate™ MSI 5X	200 µl	MD280A

Comprend : Polymerase GoTaq® MDx Hot Start, dNTPs, chlorure de magnésium et agents salins dans une solution tampon avec stabilisateurs.

Conditions de stockage : Zone de préamplification ; Tenir à l'abri de la lumière.

Diagramme de température : -30°C → -10°C (avant utilisation) ; 2°C → 10°C (après la première utilisation).

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
2800M Control DNA, 10ng/µl	25 µl	MD810A

Comprend : ADN génomique masculin standard dérivé d'une lignée cellulaire dans une solution tampon.

Conditions de stockage : Zone de préamplification ; Tenir à l'abri de la lumière.

Diagramme de température : -30°C → -10°C (avant utilisation) ; 2°C → 10°C (après la première utilisation).

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
Water, Amplification Grade	1,25 ml	MD193A

Conditions de stockage : Zone de préamplification ; Tenir à l'abri de la lumière.

Diagramme de température : -30°C → -10°C (avant utilisation) ; 2°C → 10°C (après la première utilisation).

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
Étalon de taille Size Standard 500	100 µl	MD500A

Comprend : Fragments d'ADN marqués avec des fluorochromes dans une solution tampon.

 **Conditions de stockage :** Zone de post-amplification ; Tenir à l'abri de la lumière.

Diagramme de température : -30°C → -10°C (avant utilisation) ; 2°C → 10°C (après la première utilisation).

2.2 Stockage et manutention du OncoMate™ MSI Dx Analysis System



Dès réception, stocker tous les composants à une température comprise entre -30 °C et -10 °C dans un congélateur sans dégivrage automatique. Avant la première utilisation, stocker le 2800M Control DNA entre 2 °C et 10 °C pendant au moins 8 heures. Après la première utilisation, stocker le OncoMate™ MSI Dx Analysis System entre 2 °C et 10 °C jusqu'à 3 mois. Le OncoMate™ MSI 5X Primer Mix et l'étalon de taille Size Standard 500 sont photosensibles et doivent être conservés à l'abri de la lumière. Ne pas recongeler. Stocker les réactifs de pré-amplification et de post-amplification dans des pièces séparées et les utiliser avec des pipettes, des supports à tubes (etc.) qui leur sont réservés. Les composants stockés dans des conditions autres que celles indiquées sur les étiquettes pourraient ne pas fonctionner correctement et nuire aux résultats.

2.3 Éléments non fournis

Réactifs de laboratoire

- Système d'extraction de l'ADN (voir les sections 3.3 et 3.4)
- Matrice étalon OncoMate™ 5C (réf. cat. MD3850)
- Formamide Hi-Di™ (par ex. Applied Biosystems, réf. cat. 4404307)
- Réactifs pour quantification de l'ADNdb avec fluorochromes (voir la section 3.4)
- Eau sans nucléase (Promega, réf. cat. MC1191)

Remarque : Il est essentiel d'utiliser du formamide Hi-Di™ de qualité supérieure. Congeler le formamide Hi-Di™ en aliquots entre -30 °C et -10 °C. Des cycles répétés de congélation-décongélation ou un stockage à long terme entre 2 et 10 °C peuvent provoquer la dégradation du formamide. Un formamide de mauvaise qualité peut contenir des ions qui entrent en compétition avec l'ADN pendant l'injection, ce qui provoque des hauteurs de pic plus faibles et une sensibilité réduite.

Fournitures de laboratoire

Remarque : Le matériel de laboratoire suivant est requis dans deux zones distinctes du laboratoire : l'une pour les procédures de pré-amplification et l'autre pour les procédures de post-amplification.

- Jeu de pipettes de précision calibrées pouvant distribuer entre 1µl et 1,000µl
- Pointes de pipette anti-aérosols (10µl–1,000µl)
- Microtubes à centrifuger de 1,5 ml
- Plaque de réaction optique MicroAmp® à 96 puits avec code-barres (Thermo Fisher Scientific, réf. cat. 4306737)
- Barrette à 8 capuchons MicroAmp® transparente (Thermo Fisher Scientific, réf. cat. N8010535) (pré-amplification uniquement)
- Micro-centrifugeuse personnelle (« mini-centrifugeuse »)
- Centrifugeuse compatible avec plaque de réaction à 96 puits (« centrifugeuse pour microplaques », par ex.)
- Supports pour microtubes à centrifuger
- Agitateur vortex
- Congélateur sans dégivrage automatique (entre -30°C et -10°C)
- Réfrigérateur (entre 2°C et 10°C)
- Glace pilée (post-amplification uniquement)
- Matériel d'extraction de l'ADN (blocs chauffants, centrifugeuses, etc.), en fonction de la méthode sélectionnée (pré-amplification uniquement)

Appareils et accessoires

- Appareil d'extraction d'ADN, s'il s'agit d'une méthode automatisée
- Appareil de quantification de l'ADN et fournitures associées
- Appareil d'électrophorèse capillaire et fournitures associées
- Thermocycleur compatible avec les plaques à 96 puits

Logiciel

- Logiciel d'analyse de fragments (c-à-d un logiciel capable d'analyser les fichiers .fsa générés par un appareil d'électrophorèse capillaire)

3. Avant de commencer

3.1 Avertissements et précautions

 **Avertissement en matière de sécurité chimique :** Certains des réactifs utilisés pour l'analyse des fragments sont potentiellement dangereux. Manipuler et éliminer les matières dangereuses conformément aux consignes de l'établissement en question. Le formamide est un irritant et un tératogène. Éviter l'inhalation et le contact avec la peau. Lire l'étiquette d'avertissement et prendre les précautions appropriées lors de la manipulation de cette substance. Toujours porter des gants et des lunettes protectrices lorsqu'on manipule du formamide. Consulter la fiche signalétique du formamide fournie par le fabricant avant d'utiliser ce produit.

Déclaration relative à la fiche signalétique : La fiche signalétique de ce produit contient des consignes importantes indiquant comment le manipuler, le transporter et l'éliminer en toute sécurité. Les fiches signalétiques de tous les réactifs fournis dans les kits sont consultables sur : www.promega.com/resources/msds/ ou sur demande en contactant le service technique de Promega : genetic@promega.com

Précautions en matière de biosécurité : Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été conçu pour être utilisé avec des tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Suivre les consignes de l'établissement relatives à la manipulation et à l'élimination de ces tissus.

Précautions relatives à la PCR : Les facteurs suivants peuvent influencer les résultats de la PCR : qualité de l'ADN purifié, légères modifications des tampons, force ionique, concentrations des amorces, choix du thermocycleur et conditions de thermocyclage. En conséquence, le OncoMate™ MSI Dx Analysis System exige le strict respect des procédures recommandées pour l'amplification et la détection par fluorescence décrites dans ce manuel.

Minimiser la contamination : L'analyse des microsatellites par PCR est susceptible d'être contaminée par de très petites quantités d'ADN humain. Il convient de prendre des précautions extrêmes pour éviter la contamination croisée pendant la préparation de la matrice d'ADN, la manipulation des composants des kits, la mise en place des réactions d'amplification et de l'analyse des produits de l'amplification. Stocker et utiliser les réactifs et éléments utilisés avant l'amplification (Master Mix OncoMate™ MSI 5X, OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, 2800M Control DNA et Water, Amplification Grade) dans une pièce autre que celle où sont stockés les produits de post-amplification (étalon de taille Size Standard 500). Préparer les réactions d'amplification dans un local aménagé à cet effet. Utiliser le matériel et les fournitures réservés à la mise en place de l'amplification. Toujours inclure une réaction de contrôle négatif (c.-à-d. sans matrice) pour détecter toute contamination des réactifs et une réaction de contrôle positif pour vérifier la performance des réactifs. Porter des gants et utiliser des pointes de pipette anti-aérosols pour prévenir toute contamination croisée

3.2 Exigences relatives aux échantillons

Les sections de tissu appropriées pour le test sont préparées à l'aide de formaline neutre tamponnée à 10 %, conformément aux pratiques de pathologie standard, et contiennent suffisamment de cellules nucléées et ≥ 20 % de cellules tumorales, d'après un examen pathologique. L'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été réalisée en utilisant de l'ADN extrait avec l'appareil Maxwell® CSC et le kit Maxwell® CSC DNA FFPE, qui provient d'échantillons de tissus FFPE de cancer colorectal répondant à ces critères.

3.3 Méthodes d'extraction de l'ADN et exigences relatives à sa qualité

Obtenir suffisamment d'ADN de bonne qualité provenant de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) peut être problématique. L'ADN peut être dégradé en raison d'une fixation prolongée ou inadéquate de l'échantillon de tissu avant son inclusion en paraffine, et des inhibiteurs d'amplification provenant de l'échantillon FFPE ou de la méthode d'extraction peuvent passer par le processus d'extraction. Il incombe à l'utilisateur de vérifier que la méthode de purification de l'ADN sélectionnée est compatible avec ce test. On peut utiliser des contrôles de la PCR pour détecter la présence d'inhibiteurs d'amplification dans les extraits d'ADN purifiés.

La performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évaluée avec un ADN provenant d'échantillons de tissus FFPE de cancer colorectal extrait avec le kit Maxwell® CSC DNA FFPE (réf. cat. AS1350) conjointement avec l'appareil Maxwell® CSC (réf. cat. AS6000). Il a été démontré que la présence d'une quantité d'éthanol ne dépassant pas 5 % et d'une quantité de chlorhydrate de guanidine ne dépassant pas 50 μ M dans l'ADN extrait n'interfère pas avec la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.4 Exigences relatives à la quantité d'ADN

Le kit d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System nécessite 1 ng d'ADN. Il faut quantifier l'ADN avant utilisation. Les mesures d'absorbance UV ne sont pas fiables pour quantifier l'ADNdb purifié extrait d'échantillons de tissus FFPE. Il est recommandé d'utiliser des fluorochromes se liant à l'ADNdb ou la PCR quantitative pour évaluer la concentration d'ADN. Ces deux méthodes permettent une quantification plus fiable de l'ADN purifié extrait d'échantillons de tissus FFPE, en particulier lorsque les concentrations d'ADN sont faibles ou lorsque les éluats d'ADN contiennent des contaminants ordinaires (ARN, nucléotides libres, solvants, détergents, protéines, sels, etc.).

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évalué avec des échantillons d'ADN de CCR quantifiés à l'aide de fluorochromes se liant à l'ADNdb capables de mesurer avec précision des concentrations d'ADNdb aussi faibles que 0,05 ng/ μ l. Pendant l'évaluation de la performance, l'ADN a été quantifié à l'aide du système QuantiFluor® dsDNA (réf. cat. E2670), lequel a été conçu pour une utilisation générale en laboratoire.

3.5 Exigences relatives au thermocycleur

La performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évaluée à l'aide des thermocycleurs Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® et Bio-Rad C1000 Touch™, lesquels présentent les spécifications minimales suivantes :

Vitesse de montée maximale du bloc : Entre 3,9 °C et 5 °C par seconde

Précision de la température : $\pm 0,25$ °C (à ≥ 90 °C)

Uniformité de la température : $< 0,5$ °C (à ≥ 90 °C)

Couvercle chauffant pouvant atteindre entre 103 °C et 105°C.

Le fait d'utiliser des thermocycleurs dont les spécifications sortent des plages indiquées peut nuire à la performance de ce test.

3.6 Exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire

Les produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System sont séparés en fonction de la longueur des fragments (taille) par électrophorèse capillaire. Mis à part la sélection d'un ensemble de fluorochromes basée sur la méthode AnyDye pour la calibration spectrale, on a employé la méthode d'analyse des fragments par défaut fournie par le logiciel de collecte de données et utilisé une variété de durées d'injection pour obtenir les hauteurs de pic de fragment adéquates. Concernant le 2800M Control DNA, on a ciblé une hauteur de pic d'environ 8 000 unités de fluorescence relative (RFU) pour les sept marqueurs du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. La performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évaluée à l'aide de l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx configuré avec un polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm. Les conditions de fonctionnement utilisées pendant l'évaluation de la performance figurent dans l'annexe B (section 11.2). Les appareils d'électrophorèse capillaire compatibles avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System présenteront les spécifications suivantes :

Nombre de fluorochromes détectés : ≥ 5

Longueur du réseau capillaire : des longueurs de réseau adaptées à une résolution de base unique, y compris 50 cm.

Matrice de séparation : POP-7® ou un équivalent.

Longueur d'onde d'excitation (approximative) : De 480 nm à 520 nm

Optique de détection : Les fluorochromes Promega exigent un captage des émissions entre 500 nm et 630 nm, approximativement.

Plage de résolution : Résolution 1 bp de 60 bp à ≥ 300 bp

Précision des tailles attribuées (répétabilité, exprimée en écart-type) : $\leq 0,15$ bp sur une plage de 60 bp à ≥ 300 bp

Il incombe à l'utilisateur de vérifier si l'appareil d'électrophorèse capillaire et la méthode d'analyse sélectionnés sont compatibles avec les produits amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.7 Exigences relatives à la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire

Avant la première utilisation, procéder à la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire avec la matrice étalon OncoMate™ 5C (réf. cat. MD3850). La calibration spectrale s'effectue en suivant les consignes du *manuel technique de la matrice étalon OncoMate™ 5C* (no.TM597) et en se reportant au mode d'emploi de l'appareil d'électrophorèse capillaire. Cette procédure fournit les données nécessaires permettant à l'appareil d'électrophorèse capillaire de résoudre les signaux fluorescents se chevauchant qui proviennent de plusieurs fragments d'ADN (marqués par des fluorochromes) du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Les réglages de calibration utilisés pendant l'évaluation de la performance figurent dans l'annexe A (section 11.1). Procéder à une nouvelle calibration spectrale conformément aux recommandations du fabricant de l'appareil d'électrophorèse capillaire. Par exemple, il faut procéder à une nouvelle calibration spectrale après chaque procédure de maintenance importante effectuée sur le système d'électrophorèse capillaire, comme après avoir changé la source d'excitation (laser, par ex.), étalonné ou remplacé l'optique, ou modifié le type de polymère ou le réseau capillaire.

3.8 Exigences relatives au logiciel d'analyse des données

Un logiciel d'analyse de fragments est nécessaire pour analyser les données d'électrophorèse capillaire du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Un logiciel d'analyse de fragments adapté acceptera les fichiers de données de fragments (.fsa), calculera la taille des fragments à l'aide de la méthode de Southern Blot, attribuera les fragments à un marqueur par plage de taille et étiquette fluorescente (c.-à-d. la couleur), calculera et affichera les données provenant de plusieurs fragments de diverses tailles (≥ 65 bp à 300 bp) et couleurs (≥ 5), et imprimera et exportera les données analysées selon la taille calculée des allèles et les marqueurs. Un logiciel adapté affichera également les informations sur la qualité des données (ex. pics hors échelle) capturées pendant l'électrophorèse capillaire et calculera les paramètres de base du contrôle qualité (ex. identification des pics larges) en fonction des réglages définis par l'utilisateur.

Les données générées pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System ont été analysées à l'aide du logiciel GeneMapper® (version 5.0) et des paramètres de la méthode d'analyse indiqués dans l'annexe C (section 11.3).

3.9 Exigences relatives au seuil d'analyse

L'utilisateur doit déterminer le seuil d'analyse (c.-à-d. de détection) du test avant d'analyser les données. Le seuil d'analyse définit la valeur RFU au-dessus de laquelle on peut distinguer les signaux des échantillons par rapport au bruit de l'instrumentation, permettant à l'utilisateur d'analyser en toute confiance les données des fragments. Fixer un seuil d'analyse est essentiel pour assurer la qualité des données du patient (voir la section 7.5). On trouvera dans la littérature technique des procédures pour adéquatement déterminer le seuil d'analyse (ex. Bregu, 2013). Pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System avec l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx, nous avons utilisé un seuil d'analyse de 175 RFU pour tous les canaux de fluorochromes, seuil déterminé selon la méthode de la limite supérieure qui se base sur la régression linéaire des intensités de pics générées à partir d'échantillons contenant différents teneurs en ADN (Bregu, 2013).

4. Protocole de test

Stocker les réactifs de pré-amplification et de post-amplification dans des pièces séparées. Préparer les dilutions et les réactions d'amplification de la matrice d'ADN dans un local aménagé à cet effet. Utiliser le matériel et les fournitures réservés à la mise en place de l'amplification. Porter des gants et utiliser des pointes de pipette anti-aérosols pour prévenir toute contamination croisée de l'ADN. Utiliser une pointe de pipette neuve pour chaque ajout d'échantillon d'ADN, de 2800M Control DNA et de Water, Amplification Grade (pour les contrôles négatifs) aux réactions d'amplification.

4.1 Dilution des extraits FFPE d'ADN tissulaire

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System nécessite 1,0 ng d'ADNdb par réaction fourni dans un volume de 1 µl à 6 µl. Nous recommandons de diluer l'ADN de tous les échantillons afin d'ajouter 1 ng d'ADN à chaque réaction dans un volume constant. Pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, toutes les matrices d'ADN ont été diluées à 0,5 ng/µl et un volume de 2 µl de matrice d'ADN a été ajouté à chaque réaction.

Procéder aux étapes suivantes pour les échantillons d'ADN devant être dilués avant l'amplification :

1. Agiter l'échantillon d'ADN dans l'agitateur vortex trois fois pendant 5 secondes à vitesse maximale et centrifuger brièvement (1 à 2 secondes), si nécessaire, dans une mini-centrifugeuse pour attirer l'échantillon au fond du tube.

Remarque : Le fait de ne pas correctement mélanger et diluer les échantillons d'ADN peut entraîner des erreurs de quantification et la mauvaise performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

2. Diluer l'échantillon d'ADN dans de l'eau sans nucléase (réf. cat. MC1191) dans une concentration adéquate pour permettre l'ajout de 1,0 ng d'ADNdb à chaque réaction d'amplification dans le volume de matrice souhaité (voir la section 4.3). Pour maximiser la précision, pipeter des volumes de ≥ 1 µl lors de la dilution de l'échantillon d'ADN.

Remarque : S'il est nécessaire de diluer l'échantillon, utiliser de l'eau sans nucléase. L'efficacité de l'amplification par PCR peut être considérablement altérée par des changements de pH (dus à l'ajout de Tris HCl) ou par la concentration de magnésium disponible (due à la chélation par EDTA) dans la réaction d'amplification lorsque l'on utilise des diluants à base de Tris- ou de Tris-EDTA. Le fait de ne pas correctement mélanger et diluer les échantillons d'ADN peut entraîner des erreurs de quantification et la mauvaise performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Préparer de nouveaux échantillons d'ADN dilués pour chaque expérience. Des échantillons d'ADN dilués qui ont été conservés pour une utilisation ultérieure peuvent donner lieu à une mauvaise amplification et faire échouer le test.

4.2 Dilution du 2800M Control DNA

Le 2800M Control DNA sert de contrôle positif de l'amplification (section 7.3), et non pas de contrôle MSI. Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été conçu pour être utilisé avec 1,0 ng de 2800M Control DNA fourni dans un volume de 1,0–6,0 µl. Avant l'utilisation, stocker le 2800M Control DNA (10ng/µl) entre 2 °C et 10 °C pendant au moins 8 heures. Nous recommandons de diluer le 2800M Control DNA à la même concentration que les échantillons de test. Pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, le 2800M Control DNA a été dilué à 0,5ng/µl et un volume de 2µl de 2800M Control DNA dilué a été ajouté à chaque réaction.

1. Agiter le 2800M Control DNA à l'agitateur vortex trois fois pendant 10 secondes, à vitesse maximale.
2. Diluer le 2800M Control DNA dans de l'eau sans nucléase (réf. cat. MC1191) ou dans de Water, Amplification Grade, de manière à ajouter 1,0 ng à la réaction de contrôle positif dans le volume souhaité (1–6 µl). Voir le tableau 2 pour des exemples de dilution. Pour une meilleure précision, pipeter des volumes de ≥1 µl lors de la préparation des dilutions du 2800M Control DNA.

Tableau 2. Dilution du 2800M Control DNA.

Volume de matrice d'ADN par réaction	Volume du 2800M Control DNA (10ng/µl)	Volume d'eau 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

¹Eau sans nucléase ou Water, Amplification Grade.



Remarque : Préparer une nouvelle dilution du 2800M Control DNA pour chaque expérience. Des 2800M Control DNA dilués qui ont été conservés pour une utilisation ultérieure peuvent donner lieu à une mauvaise amplification et faire échouer le test.

4.3 Préparation des réactions d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1. Lors de la première utilisation, décongeler complètement le OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, le Master Mix OncoMate™ MSI 5X et la Water, Amplification Grade. Après la première utilisation, stocker les réactifs entre 2 °C et 10 °C jusqu'à 3 mois.
2. Centrifuger brièvement les tubes (1–2 secondes) dans une mini-centrifugeuse pour amener le contenu vers le fond et agiter les réactifs à l'agitateur vortex trois fois pendant 3 secondes, à vitesse maximale. Ne pas centrifuger après agitation car les réactifs pourraient alors former un gradient de concentration dans le tube.
3. Apposer un code-barres sur une nouvelle plaque de réaction optique MicroAmp® à 96 puits.
4. Déterminer le nombre de réactions à préparer. Il faut compter au moins une réaction de contrôle d'amplification positif et de contrôle d'amplification négatif pour chaque plaque. Ajouter des réactions supplémentaires pour compenser les erreurs de pipetage. Bien que cette approche gaspille une petite quantité de chaque réactif, elle permet de garantir une quantité suffisante de mélange d'amplification par PCR pour tous les échantillons.
5. Préparer le mélange d'amplification PCR comme décrit dans le tableau 3. Ajouter le volume final de Water, Amplification Grade, le Master Mix OncoMate™ 5X et le OncoMate™ MSI 5X Primer Mix dans un tube propre de 1,5 ml. La matrice d'ADN sera ajoutée individuellement dans chaque puits de réaction à l'étape 7.

Remarque : Le tableau 3 suppose que la matrice d'ADN est ajoutée à la réaction pendant l'étape 7, dans un volume constant pour tous les échantillons.

Tableau 3. Préparation du mélange d'amplification par PCR.

Composant du mélange d'amplification par PCR ¹	Volume par réaction	×	Nombre de réactions	=	Volume final
Water, Amplification Grade	à un volume final de 10 µl	×		=	
Master Mix OncoMate™ MSI 5X ²	2 µl	×		=	
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	2 µl	×		=	
Matrice d'ADN (1,0 ng)	jusqu'à 6 µl				
Volume total de réaction	10 µl				

¹Ajouter la Water, Amplification Grade, le Master Mix OncoMate™ 5X et le OncoMate™ MSI 5X Primer Mix dans un tube neuf de 1,5 ml. La matrice d'ADN sera ajoutée individuellement dans chaque puits de réaction à l'étape 7.

²Un précipité peut se former dans le Master Mix OncoMate™ MSI 5X. La présence du précipité ne nuira pas à l'amplification de l'ADN effectuée avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

6. Agiter le mélange d'amplification par PCR dans l'agitateur vortex trois fois pendant 3 secondes à vitesse maximale, puis pipeter l'équivalent d'une réaction de mélange d'amplification dans chaque puits de la/des plaque(s) de réaction utilisée(s) pour les échantillons et les contrôles.

Remarque : Si le mélange d'amplification par PCR n'est pas suffisamment agité dans l'agitateur vortex, cela peut donner lieu à une mauvaise amplification ou un déséquilibre entre marqueurs. Dès que le mélange d'amplification par PCR est prêt, l'ajouter aux puits de la plaque de réaction. Procéder rapidement aux étapes 7 à 10, suivies immédiatement du thermocyclage.

7. Agiter chaque matrice d'ADN FFPE (préparé à la section 4.1) dans l'agitateur vortex trois fois pendant 5 secondes, à vitesse maximale et centrifuger brièvement (1-2 secondes) dans une mini-centrifugeuse pour attirer le liquide au fond du tube. Pipeter 1,0 ng de l'échantillon dans le puits (réservé à cet effet) de la plaque contenant le mélange d'amplification PCR. Mélanger en pipétant plusieurs fois.

8. Agiter le 2800M Control DNA (préparé à la section 4.2) dans l'agitateur vortex trois fois pendant 10 secondes à vitesse maximale et centrifuger brièvement (1-2 secondes) dans une mini-centrifugeuse pour attirer le liquide au fond du tube. Pipeter 1,0 ng du 2800M Control DNA dilué dans le(s) puits réservé(s) à la/aux réaction(s) de contrôle positif. Mélanger en pipetant plusieurs fois.
9. Pour le contrôle d'amplification négatif, pipeter un volume de Water, Amplification Grade équivalent au volume de la matrice d'ADN dans le(s) puits réservé(s) à la/aux réaction(s) de contrôle négatif. Ne pas ajouter la matrice d'ADN aux réactions de contrôle négatif. Mélanger en pipetant plusieurs fois.

Remarque : Le fait de ne pas amplifier et analyser les réactions de contrôle négatif et positif peut favoriser l'incertitude pendant l'analyse des données des résultats et compliquer le dépannage. Il faut inclure des réactions de contrôle positif et négatif sur chaque plaque.

10. Fermer les puits avec les barrettes à 8 capuchons MicroAmp® et centrifuger brièvement dans la centrifugeuse pour microplaques pour attirer le contenu au fond des puits et éliminer les bulles d'air.

4.4 Thermocyclage

1. S'assurer que le couvercle chauffant a atteint la température programmée (103–105 °C) et placer la plaque de réaction dans un thermocycleur. Fermer le couvercle du thermocycleur.
2. Programmer le thermocycleur conformément aux consignes du fabricant pour exécuter le protocole indiqué au schéma 4. Confirmer que le volume de réaction est réglé sur 10 µl. La durée totale du thermocyclage, montée comprise, est d'environ 1 heure et 15 minutes.

Protocole de thermocyclage¹

96 °C pendant 1 minute, puis :

96 °C pendant 10 secondes

58 °C pendant 1 minute

72 °C pendant 30 secondes

pendant 29 cycles, puis :

60 °C pendant 10 minutes, puis :

maintenir à 4 °C

¹Volume de réaction : 10 µl ; couvercle chauffant : 103–105 °C

Schéma 4. Protocole de thermocyclage du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3. Après avoir effectué le protocole de thermocyclage, procéder à l'analyse des fragments par électrophorèse capillaire ou entreposer les produits d'amplification à l'abri de la lumière pendant une nuit entre 2 et 10 °C ou à long terme entre -30 et -10 °C.



Remarque : Le fait de stocker les échantillons amplifiés à long terme à des températures supérieures à -10 °C peut produire des artefacts qui interfèrent avec l'analyse des données.

4.5 Préparation de l'appareil d'électrophorèse capillaire



Voir la section 3.6 pour consulter les exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire. Suivre les consignes du fabricant concernant le fonctionnement et l'entretien de l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné et concernant l'utilisation du polymère et des réseaux capillaires associés.

1. S'assurer que le polymère et les tampons de l'appareil ne sont pas périmés et qu'un nombre suffisant d'échantillons ou d'injections sont disponibles pour effectuer l'analyse prévue.
2. Le cas échéant, préchauffer le four du système d'électrophorèse capillaire conformément aux consignes du fabricant pendant au moins 30 minutes avant de démarrer un cycle.

4.6 Préparation des fragments amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System pour l'électrophorèse capillaire

1. Si les échantillons amplifiés ont été stockés entre -30 et -10 °C, les décongeler complètement avant de poursuivre. Agiter pendant 5 secondes à l'agitateur vortex et centrifuger la plaque pendant 5 à 10 secondes dans une centrifugeuse pour microplaques pour attirer le contenu au fond des puits.
2. Déterminer combien de puits sont nécessaires pour analyser tous les échantillons amplifiés, y compris les réactions de contrôle positif et négatif. Ajouter à ce nombre tous les puits inutilisés à partir desquels une injection sera amorcée, ainsi que des puits supplémentaires pour compenser les erreurs de pipetage.
3. Agiter l'étalon de taille Size Standard 500 à l'agitateur vortex trois fois pendant 3 secondes et à vitesse maximale, et préparer le cocktail de chargement pour électrophorèse capillaire comme indiqué dans le tableau 4.



Remarque : Le formamide est un irritant et un tératogène. Éviter l'inhalation et le contact avec la peau. Lire l'étiquette d'avertissement et prendre les précautions appropriées lorsqu'on manipule cette substance. Toujours porter des gants et des lunettes protectrices lorsqu'on manipule du formamide.

Tableau 4. Préparation du cocktail de chargement pour électrophorèse capillaire.

Cocktail de chargement	Volume par puits	×	Nombre de puits	=	Volume final
Formamide Hi-Di™	9,5 µl	×		=	
Étalon de taille Size Standard 500	0,5 µl	×		=	
Volume total	10 µl				

4. Agiter le cocktail de chargement dans l'agitateur vortex trois fois pendant 3 secondes à vitesse maximale et centrifuger brièvement (1 à 2 secondes) dans une mini-centrifugeuse pour attirer les réactifs au fond du tube.
5. Pipeter 10 µl du cocktail de chargement dans chacun des puits réservés de la plaque de réaction optique MicroAmp® Optical à 96 puits avec l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné.

Remarque : Il faut ajouter le cocktail de chargement ou le formamide Hi-Di™ dans chacun des puits à partir desquels une injection est initiée, que des produits amplifiés soient également ajoutés au puits ou non. Le fait de ne pas ajouter le cocktail de chargement ou le formamide Hi-Di™ dans un puits qui fait l'objet d'une injection peut endommager le réseau capillaire et provoquer l'échec du test.

6. Ajouter 1 µl de l'échantillon amplifié ou de la réaction de contrôle à chaque puits désigné.
7. Couvrir les puits avec le tapis de protection conformément aux consignes du fabricant de l'appareil.

8. Centrifuger la plaque pendant 5 à 10 secondes pour attirer le mélange formamide-échantillon au fond des puits et éliminer les bulles d'air.
9. Dénaturer les échantillons à 95 °C pendant 3 minutes dans un thermocycleur, puis refroidir immédiatement la plaque de réaction sur de la glace pilée pendant au moins 3 minutes. Dénaturer les échantillons juste avant de charger la plaque sur l'appareil d'électrophorèse capillaire.
Remarque : Ne pas fermer le couvercle chauffant du thermocycleur, car cela pourrait faire fondre le tapis de protection.
10. Charger la plaque sur l'appareil d'électrophorèse capillaire conformément aux consignes du fabricant. Le cas échéant, s'assurer que le four a atteint la température requise avant de charger la plaque.

4.7 Détection de fragments amplifiés par électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence

Consulter le manuel technique de l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné pour plus d'informations sur la réalisation d'un cycle d'analyse de fragments, y compris sur la configuration de la calibration spectrale et des méthodes d'analyse des fragments, l'ajout d'informations sur les échantillons, le chargement des échantillons dénaturés sur l'appareil, le démarrage d'un cycle et la récupération des données d'un cycle achevé. Lors de la programmation de l'appareil, démarrer par la méthode d'analyse des fragments par défaut pour la configuration spécifique de l'appareil. Il faudra peut-être optimiser la durée de l'injection pour répondre aux besoins individuels du laboratoire. Il incombe à l'utilisateur de s'assurer que les conditions d'électrophorèse capillaire sélectionnées sont compatibles avec le test. Contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega, ou envoyer un courriel à : genetic@promega.com pour plus d'informations.

5. Analyse des données

5.1 Introduction

L'électrophorèse capillaire des produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System permet d'obtenir des fichiers de données (.fsa) qui nécessitent une analyse en aval effectuée par un logiciel d'analyse de fragments (schéma 5). Les objectifs de l'analyse des données sont de fournir des informations de base sur la qualité des données, de mesurer les pics de fragments dans la plage d'analyse définie, d'aider à filtrer les pics de « glissement » parmi les pics d'allèles présents dans chaque marqueur et de résumer la ou les tailles des allèles par marqueur pour interpréter les résultats en aval. Procéder aux étapes suivantes pour analyser les données d'électrophorèse capillaire avec un logiciel d'analyse de fragments :

À effectuer une fois, avant la première analyse ; voir l'annexe C (section 11.3) pour consulter les consignes :

- Définir les tailles connues des fragments de l'étalon de taille (c.-à-d. créer ou importer l'étalon de taille du test).
- Attribuer à chaque marqueur une plage de taille d'analyse (c.-à-d. créer ou importer les panels de test).
- Régler les paramètres d'analyse (c.-à-d. créer ou importer la méthode d'analyse).
- Facultatif : Gérer l'affichage des données (c.-à-d. créer ou importer les réglages de tableau, de tracé et de rapport).

À effectuer pour chaque lot d'échantillons analysés ; voir les consignes à la section 5.2 :

- Importer les fichiers de données.
- Sélectionner les données d'analyse entrantes (c.-à-d. étalon de taille, panels de test et méthode d'analyse).
- Effectuer l'analyse des données.
- Résumer la taille des allèles par marqueur.

La performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évaluée en utilisant le logiciel GeneMapper®. Les paramètres d'analyse finale des données utilisés pendant l'évaluation de la performance du test sont fournis à titre de référence à l'annexe C. (section 11.3). Ces réglages ont été optimisés pour identifier le plus petit allèle distinct (en bp) de chaque marqueur de répétition de mononucléotides et pour le distinguer des pics de « glissement » pour analyse en aval. Dans certaines circonstances spécifiques, on peut filtrer les allèles distincts présents dans un échantillon lorsque l'on utilise les réglages d'analyse recommandés. Ces allèles filtrés ne s'utilisent pas pour déterminer la stabilité du marqueur (voir la section 6.4), car ils ne sont pas le plus petit allèle distinct de ce marqueur. Le processus d'analyse des données de fragments est représenté par le schéma 5 et décrit ci-dessous dans la section 5.2 en utilisant le logiciel GeneMapper® comme exemple. Pour des consignes supplémentaires sur l'analyse des données de fragments avec le logiciel GeneMapper®, se reporter au *Guide de l'utilisateur pour analyse des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire [DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide]* de Thermo Fisher Scientific.

Remarques :

1. La méthode d'analyse et les réglages de panel du OncoMate™ MSI Dx Analysis System ont été déterminés à l'aide de données générées par l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx avec le polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm. L'analyse des données obtenues en utilisant plusieurs configurations de l'appareil d'électrophorèse capillaire peut nécessiter la modification des fichiers de panel et de méthode d'analyse. Pour obtenir de l'aide, contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega, ou envoyer un courriel à : genetic@promega.com
2. Les réglages de méthode d'analyse spécifiés à l'annexe C peuvent servir de modèle pour développer des réglages d'analyse pour votre système d'électrophorèse capillaire. Toutefois, les seuils d'analyse (« Seuils d'amplitude des pics » dans l'onglet « Détecteur de pics » de l'Éditeur de méthode d'analyse du logiciel GeneMapper®) doivent être déterminés par le laboratoire individuel en fonction de l'intensité des pics d'échantillons ciblée, de la plage dynamique de l'appareil et du bruit/signal de fond observé dans les données analysées (se reporter à la section 7.5). Pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, on a utilisé un seuil d'analyse de 175 RFU pour chaque canal de couleur (B, G, Y, O). Pour une instrumentation d'électrophorèse capillaire adaptée, les seuils d'analyse sont typiquement entre 50 RFU et 200 RFU. Pour une explication sur la bonne utilisation et les effets des différents réglages d'analyse, se reporter au *Guide de l'utilisateur pour analyse des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire [DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide]* de Thermo Fisher Scientific.



Schéma 5. Processus d'analyse des données d'électrophorèse capillaire du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

5.2 Analyser les données

Les consignes indiquant comment analyser les données à l'aide du logiciel GeneMapper® sont fournies ici par souci de commodité. Ces consignes présupposent que l'utilisateur a importé les fichiers de réglages GeneMapper® disponibles qui sont décrits à l'annexe C (section 11.3) ou qu'il a créé des fichiers de réglages similaires. Si l'on utilise un autre logiciel d'analyse des données, se reporter aux informations et consignes de son mode d'emploi.

1. Ouvrir le logiciel GeneMapper®, version 5.0 ou 6.0.
2. Sélectionner l'icône « Nouveau projet [New Project] » () dans la barre d'outils et choisir **Microsatellite** comme type de projet.
3. Pour importer les données, sélectionner l'icône « Ajouter des échantillons au projet [Add Samples To Project] » () dans la barre d'outils.
4. Dans le menu déroulant « Réglage du tableau [Table Setting] » de la barre d'outil, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0**.
5. Si le champ « Type d'échantillon [Sample Type] » n'est pas renseigné, choisir **Échantillon [Sample]**, **Contrôle positif [Positive Control]** ou **Contrôle négatif [Negative Control]** pour décrire chaque échantillon.
6. Pour tous les échantillons de contrôles et échantillons patient, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0** pour la « Méthode d'analyse [Analysis Method] », **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** pour le « Panel » et **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** pour l'« étalon de taille [Size Standard] ».
7. Sélectionner l'icône « Analyser [Analyze] » () dans la barre d'outils pour analyser les échantillons. Dans la fenêtre contextuelle « Enregistrer le projet [Save Project] », saisir un nom de projet descriptif, puis cliquer sur **OK**.

Remarque : Après l'analyse, on peut trier les échantillons via la fonctionnalité **Trier... [Sort...]** située sous le menu **Éditer [Edit]** (par ex., par **type d'échantillon** et par **nom d'échantillon**). Le fait de réorganiser les échantillons de façon à ce que chaque paire d'échantillons normaux et tumoraux soit adjacente dans la liste d'échantillons facilitera l'affichage et l'examen des échantillons, lorsque l'on utilise le fichier « Réglages des tracés [Plot Settings] » fourni (voir l'étape 8). On peut également utiliser la fonctionnalité de tri pour s'assurer que les électrophorégrammes de la paire d'échantillons normaux et tumoraux sont imprimés sur la même page (voir l'étape 9c).

8. Examiner les échantillons de contrôle et échantillons patient pour évaluer leur qualité, comme l'indique la section 6.3. Sélectionner les rangées qui contiennent les échantillons de contrôle et échantillons patient et sélectionner l'icône « Afficher les tracés [Display Plots] » () dans la barre d'outils pour afficher les électrophorégrammes et les données alléliques mises en tableau. Dans le menu déroulant « Réglage des tracés [Plot Setting] » de la barre d'outils, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Plot_v1.0**.

Remarque : Il est nécessaire d'examiner les électrophorégrammes des échantillons pour évaluer la qualité des données. Nous recommandons d'examiner les échantillons de contrôle avant d'examiner les échantillons patient. Les échantillons de contrôle sélectionnés en même temps que les échantillons patient sont affichés en permanence dans la fenêtre « Tracé des échantillons [Samples Plot] » et ne peuvent pas être minimisés, ce qui encombre l'écran.

9. Examiner les échantillons patient valables pour vérifier le statut MSI, tel que décrit aux sections 6.4 et 6.5. Afficher les données des échantillons tel que décrit à l'étape 8. Pour faciliter l'interprétation des données, on peut exporter les données de taille pour les analyser en aval de plusieurs manières, notamment tel que décrit ici.

Remarque : Ces options d'exportation des données sont uniquement fournies à titre d'information. Il incombe au laboratoire qui exécute le test de sélectionner le format de données le plus approprié pour déterminer le statut MSI en aval. Pour obtenir de l'aide dans l'élaboration d'une méthode de génération de rapports pour votre laboratoire, contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega, ou envoyer un courriel à : genetic@promega.com

- a. On peut exporter un fichier texte contenant la taille des allèles filtrés et d'autres données d'échantillon, sous forme de « Tableau des génotypes [Genotypes Table] » comme suit :
 - i. Sur l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons de contrôle, puis sélectionner l'icône « Afficher les tracés [Display Plots] » () dans la barre d'outils pour ouvrir la fenêtre « Tracé des échantillons [Samples Plot] ».
 - ii. Si le « tableau des génotypes [Genotypes Table] » ne s'affiche pas sous le ou les électrophorégrammes, sélectionner l'icône « Tableau des génotypes [Genotypes Table] » () dans la barre d'outils.
 - iii. Sélectionner **Exporter tableau [Export Table]** dans le menu **Fichier [File]**, puis enregistrer le fichier pour analyse en aval.
 - b. On peut exporter sous forme de « rapport » un fichier texte contenant la taille des allèles filtrés et d'autres données d'échantillon, de la manière suivante :
 - i. Sur l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons de contrôle, puis sélectionner l'icône « Gestionnaire de rapports [Report Manager] » () dans la barre d'outils pour ouvrir la fenêtre du gestionnaire de rapports.
 - ii. Dans le menu déroulant « Réglage de rapport [Report Setting] » de la barre d'outils, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0**.
 - iii. Sélectionner **Exporter... [Export...]** dans le menu **Fichier [File]**, nommer le fichier et sélectionner **Exporter [Export]**.
- Remarque :** On peut exporter plusieurs champs de données sous forme de « tableau des génotypes » plutôt que de « rapport ». Pour répondre aux besoins spécifiques du laboratoire, on peut ajouter des champs en éditant les fichiers « Réglages de tableau [Table Settings] » ou « Réglages de rapport [Report Settings] » OncoMate™ fournis dans le gestionnaire de GeneMapper®.
- c. On peut enregistrer sous format .pdf un résumé des données affichant les électrophorégrammes et les tailles d'allèles mises en tableau de la manière suivante :
 - i. Sur l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons de contrôle, puis sélectionner l'icône « Afficher les tracés [Display Plots] » () pour ouvrir la fenêtre « Tracé des échantillons [Samples Plot] ».
 - ii. Sélectionner **Imprimer... [Print...]** dans le menu **Fichier [File]**. Choisir **Microsoft Imprimer au format PDF [Microsoft Print to PDF]** (ou l'équivalent) comme « Service d'impression [Print Service] », puis **Paysage [Landscape]** pour l'orientation. Sélectionner **Imprimer [Print]** et saisir un nom d'échantillon pour le fichier .pdf généré.

Remarque : Pendant cette procédure, il est possible de générer plusieurs fichiers .pdf avec des noms différents. Ainsi, un laboratoire peut choisir de générer un fichier .pdf pour chaque paire d'échantillons.

6. Examen et interprétation des résultats

Cette section comprend les considérations en matière d'évaluation de la qualité des données et d'interprétation du statut MSI des échantillons analysés avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Le logiciel d'analyse des fragments proposera peut-être plusieurs options pour l'affichage et l'examen des données. Par exemple, le logiciel GeneMapper® fournit toute une variété d'options pour afficher et résumer les données d'échantillon. Pour des informations supplémentaires sur l'examen des données, se reporter au *Guide de l'utilisateur pour analyse des fragments d'ADN par électrophorèse capillaire [DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide]* de Thermo Fisher Scientific.

6.1 Comprendre les données du OncoMate™ MSI Dx Analysis System

L'analyse des produits de PCR du OncoMate™ MSI Dx Analysis System génère des données sur la longueur des fragments d'ADN de chacune des régions microsatellitaires amplifiées. On interprète les données d'une paire appariée d'échantillons normaux et tumoraux en évaluant les cinq marqueurs de répétition de mononucléotides (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et MONO-27) et deux marqueurs de répétition de pentanucléotides (Penta C et Penta D) amplifiés par le OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

On analyse les marqueurs de répétition de mononucléotides pour déterminer le statut MSI du patient. L'amplification par PCR des marqueurs de répétition de mononucléotides produit un pic de l'allèle principal et une distribution plus ou moins en forme de cloche de pics de « glissement » adjacents, chacun séparé par 1 bp (Bacher, 2004). Dans toute distribution individuelle de pics de « glissement », le pic ayant la valeur de fluorescence (RFU) la plus élevée est le pic d'allèle (schéma 6). Il peut y avoir plus d'une distribution de pic de « glissement » et d'un allèle par marqueur pour les échantillons de tissus normaux (hétérozygotes) et tumoraux (hétérozygotes ou instables). Un logiciel d'analyse des fragments, à l'instar du logiciel GeneMapper®, utilise des algorithmes de filtrage des pics pour isoler les allèles présents dans chaque marqueur des pics de « glissement ». La taille de ces allèles est affichée sur un électrophorégramme et mise en tableau pour l'interprétation du statut MSI en aval.

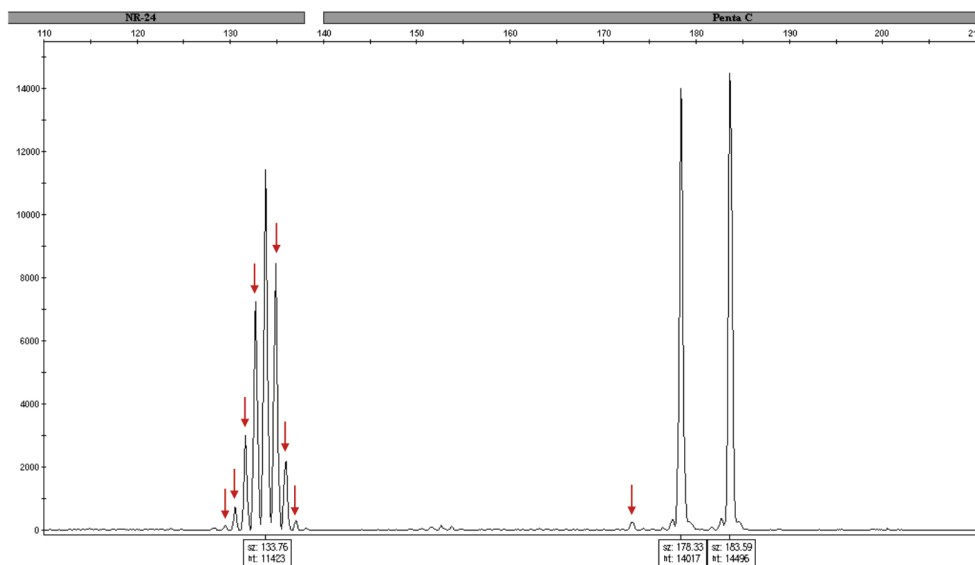


Schéma 6. Les pics de « glissement » (indiqués par des flèches) – générés par le glissement de la polymérase pendant l'amplification par PCR de répétitions en tandem courtes – sont clairement visibles au niveau des marqueurs de mononucléotides à des intervalles de 1 bp à partir du pic d'allèle le plus authentique, ou le plus élevé, représenté ici à l'aide du marqueur NR-24 (gauche). On pourrait également voir de bien plus petits pics de « glissement » au niveau des marqueurs de pentanucléotides à 5 bp des pics d'allèle authentiques, représentés ici à l'aide du marqueur Penta C.

Lorsque l'un des marqueurs d'un échantillon tumoral est instable, on détectera un ou plusieurs nouveaux allèles distincts du ou des allèles normaux (schéma 7). On détecte une différence dans la taille des allèles en comparant les données de l'échantillon tumoral à celles de l'échantillon normal auquel il est apparié. On donne la classification MSI-H à un échantillon tumoral lorsque $\geq 40\%$ des marqueurs de répétition de mononucléotides présentent de nouveaux allèles (c.-à-d. lorsque ≥ 2 marqueurs sur 5 affichent des « profils alléliques modifiés »). On peut donner la classification MSS aux échantillons tumoraux présentant moins de deux marqueurs de répétition de mononucléotides modifiés (Umar, 2004 ; Boland, 1998).

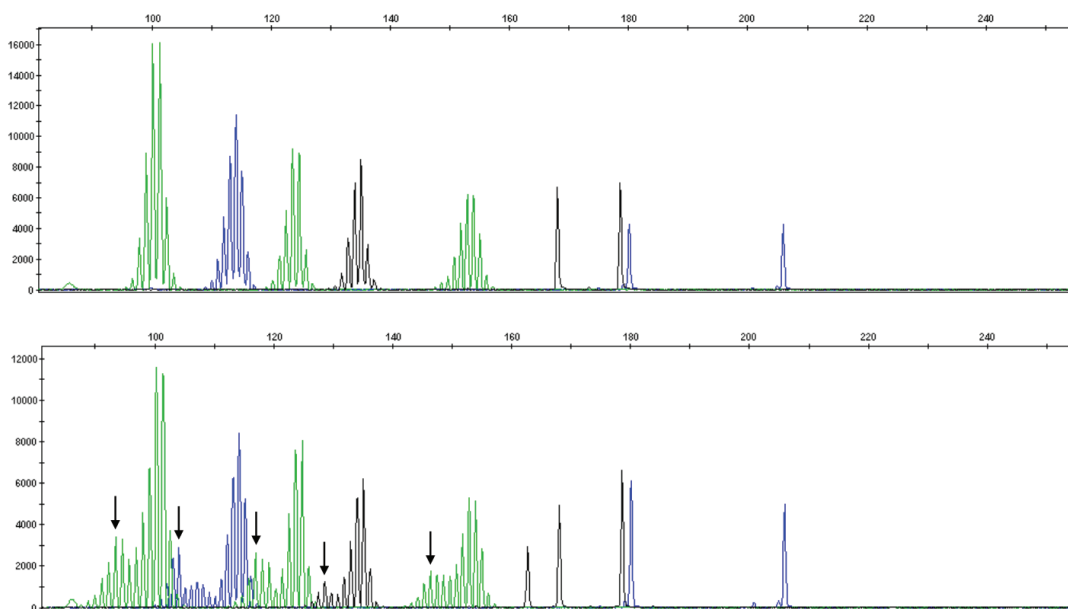


Schéma 7. Les échantillons normaux (panneau du haut) et tumoraux (panneau du bas) appariés ont été analysés avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Un nanogramme d'ADN a été amplifié et analysé à l'aide de l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx avec un polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm. La présence de nouveaux allèles dans l'échantillon tumoral (indiqués par des flèches) qui étaient absents de l'échantillon de référence normal indique une instabilité des marqueurs. L'échantillon affiché est MSI-H, car au moins 2 marqueurs de répétition de mononucléotides indiquent une instabilité.

6.2 Résumé des artefacts d'amplification connus et des anomalies d'électrophorèse capillaire

Lorsque l'on utilise un polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm pour l'électrophorèse capillaire, on observe un artefact d'amplification connu dans le marqueur NR-21 sous forme de large pic unique mesurant entre 83 bp et environ 90 bp (schéma 8). Ce pic ne devrait pas être considéré comme un allèle lorsque l'on détermine la stabilité du marqueur NR-21. La présence de pics $n-1$ bp de faible intensité est fréquente chez les marqueurs de répétition de pentanucléotides, Penta D et Penta C.

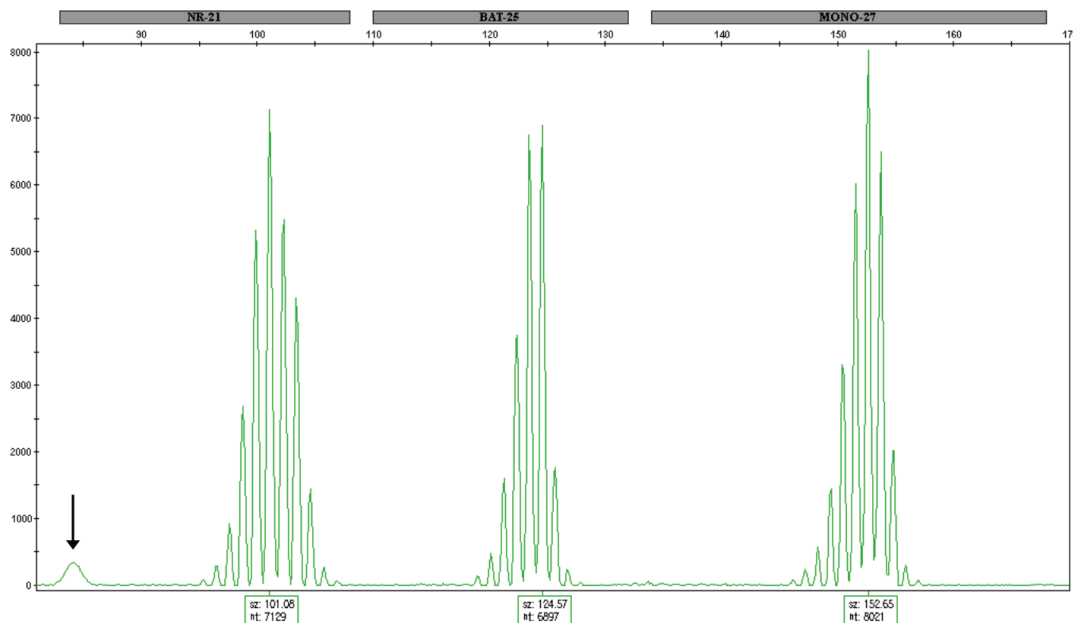


Schéma 8. On peut observer un artefact d'amplification (indiqué par une flèche) dans le marqueur NR-21 sous la forme d'un pic unique large mesurant entre 83 bp et environ 90 bp. Ce pic ne devrait pas être considéré comme un allèle lorsque l'on détermine la stabilité du marqueur NR-21.

D'autres artefacts d'amplification peuvent se produire lorsque l'on introduit trop de données ADN dans le OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Le signal de base du marqueur BAT-26 (canal bleu) peut s'amplifier et devenir irrégulier. Sauf en cas de teneurs ADN extrêmes (≥ 4 ng de 2800M Control DNA, par ex.), le fait d'adopter les paramètres de filtrage de pic suggérés pour le GeneMapper® (voir l'annexe C) permettra d'éliminer ces artefacts lors de l'identification des allèles du marqueur BAT-26.

On peut observer d'autres anomalies connues, mais aléatoires, pendant l'électrophorèse capillaire. Trois de ces rares anomalies prédominent : des injections ratées, des pics larges et des pointes de signal.

- a. Lorsqu'une injection échoue, peu ou pas d'échantillon d'ADN se retrouve injecté dans le réseau capillaire. Dans ces cas, on observera un échec du contrôle qualité de la détermination des tailles (voir le tableau 5) en raison de l'absence (ou de la mauvaise qualité) des pics de l'étalon de taille Size Standard 500. La qualité des mesures de taille (sizing Quality) est une caractéristique du logiciel GeneMapper® qui calcule un score en fonction de la forme du pic, de la correspondance des tailles et de la courbe de comparaison. Le réglage figure dans la méthode d'analyse.
- b. Un pic présentant une morphologie large (c.-à-d. qui n'est pas pointu) peut être détecté pendant l'électrophorèse capillaire. Ce pic large peut être occasionné par des cristaux ou d'autres matériaux aberrants migrant à travers le réseau capillaire.
- c. On peut observer une « pointe » du signal pendant l'électrophorèse capillaire sous forme de pic à la largeur quasi-nulle sur l'ensemble des canaux de couleur. Pendant l'identification des allèles, la plupart des logiciels d'analyse de fragments détectent et ignorent ces pointes.

6.3 Exigences en matière de contrôle de la qualité pour l'interprétation des données

Comprendre la qualité des données du OncoMate™ MSI Dx Analysis System est essentiel pour correctement interpréter le statut MSI d'un patient. Il faut mettre en place un ensemble de contrôles de test (contrôles positifs et négatifs) pour veiller à pouvoir se fier aux données acquises via ce test et utilisées pour l'interprétation du statut MSI (section 7). Avant de déterminer le statut MSI d'un échantillon, on effectue une série de contrôles qualité des données (CQ) pour établir la fiabilité des données auprès de l'utilisateur (tableau 5). La plupart des contrôles qualité (CQ) décrits ci-dessous impliquent d'inspecter visuellement les électrophorégrammes des échantillons ; le fait d'évaluer uniquement le tableau des allèles d'un lot d'échantillons spécifique ne suffit pas pour déterminer la qualité des données.

Le tableau 5 présentent les types d'échantillons évalués pour chaque CQ et l'impact d'un échec de CQ. Suite à un contrôle qualité des données, le statut de chaque échantillon patient affichera soit « Non valable [Invalid] » (signifiant que l'interprétation du statut MSI n'est pas possible en raison d'un grave échec du CQ des données) soit « Valable [Valid] » (signifiant qu'un grave échec du CQ des données n'a pas été observé ou que, malgré un échec CQ, l'interprétation du statut MSI du patient reste possible d'après les consignes de la section 6.5.3.). Lorsqu'un échantillon de contrôle échoue à certains contrôles qualité des données, la qualité de tous les échantillons patient qui y sont associés peut être compromise, et le statut « Non valable [Invalid] » s'applique à tous les échantillons du lot. Lorsque les contrôles positifs et négatifs ont réussi tous les tests CQ, un échantillon patient peut réussir ou échouer à un test CQ des données. Le statut de l'échantillon patient associé à un échec de CQ est basé sur le fait que l'échec concerne un contrôle positif ou négatif d'amplification ou bien un échantillon patient. Les échantillons qui ne satisfont pas aux exigences de CQ seront traités conformément aux consignes figurant dans la section Dépannage de ce manuel technique. Nous recommandons un processus de contrôle de la qualité des données comme suit :

1. Évaluer la qualité de tous les échantillons de contrôle et échantillons patient en termes de taille.
2. Évaluer les contrôles des lots (c.-à-d. les contrôles d'amplification positifs et négatifs).
3. Évaluer les échantillons patient.

Tableau 5. Test de CQ des données à effectuer avant l'interprétation du statut MSI pour comprendre la qualité des données du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

				Statut de l'échantillon patient quand un échantillon de contrôle ou un échantillon patient échoue au test de CQ correspondant	
Section	Test de CQ	Description du test de CQ	Échantillons évalués¹	L'échantillon de contrôle échoue le CQ²	L'échantillon patient échoue le CQ³
6.3.1	CQ relatif à la qualité des tailles	Le score de qualité est calculé en fonction de la forme du pic, de la correspondance des tailles et de la courbe de comparaison.	+, -, N, T	Tous les échantillons sont non valables	Échantillon non valable
6.3.2	CQ du contrôle négatif	Pour le contrôle d'amplification négatif, aucun pic au-dessus du seuil d'analyse ne doit avoir été détecté.	–	Tous les échantillons sont non valables	Échantillons patient non évalués
6.3.3	CQ de l'identité du contrôle positif	Pour le contrôle positif de l'amplification, les allèles présents dans les marqueurs pentanucléotides doivent correspondre aux allèles attendus du 2800M Control DNA à 1,5 pb près.	+	Tous les échantillons sont non valables	Échantillons patient non évalués
6.3.4	CQ de pics hors échelle	L'intensité (en RFU) des pics d'un échantillon donné ne doit pas dépasser la plage maximale détectable de l'électrophorèse capillaire.	+, N, T	Tous les échantillons sont non valables	Échantillon non valable
6.3.5	CQ relatif à l'interférence spectrale	Les pics alignés selon leur longueur dans différents canaux de fluorochrome sont évalués pour identifier une interférence spectrale (c.-à-d. l'infiltration du signal entre les canaux de fluorochromes).	+, N, T	Tous les échantillons sont non valables	Échantillon non valable
6.3.6	CQ relatif aux pics larges	La largeur des pics ne doit pas dépasser la valeur qui a été attribuée pour l'analyse MSI.	+, N, T	Voir la note de bas de page no.4	Voir la note de bas de page no.4
6.3.7	CQ relatif à l'amplification des allèles	Chaque marqueur doit comporter au moins un allèle supérieur au seuil d'analyse.	+, N, T	Tous les échantillons sont non valables	Marqueur non valable ; l'échantillon peut être interprété
6.3.8	CQ relatif à la contamination de l'ADN	Pour chaque marqueur pentanucléotide, il ne peut pas y avoir plus de deux allèles présents dans l'échantillon normal.	+, N	Tous les échantillons sont non valables	Échantillon non valable
6.3.9	CQ de l'identité de l'échantillon patient	Pour chaque marqueur pentanucléotide, les allèles identifiés dans l'échantillon normal doivent être présents dans l'échantillon tumoral (à 1,5 pb près).	T	Contrôles non évalués	Voir la note de bas de page no.5
6.3.10	CQ du signal de l'échantillon tumoral	Pour les marqueurs mononucléotidiques qui ont été interprétés comme étant stables, la ou les hauteurs de pic des allèles de l'échantillon tumoral doivent être suffisantes pour assurer la sensibilité du test. L'intensité maximale exigée est basée sur le seuil d'analyse et le contenu tumoral de l'échantillon.	T	Contrôles non évalués	Marqueur non valable ; l'échantillon peut être interprété

¹ N, échantillon normal ; T, échantillon tumoral ; +, contrôle positif ; -, contrôle négatif

² Résultat interprétatif du statut MSI pour tous les échantillons patient du lot lorsqu'un échantillon de contrôle présente le problème de CQ associé.

³ La colonne indique si les échantillons patient sont non valables ou s'ils peuvent quand même être interprétés lorsqu'ils sont affectés par le problème de CQ associé malgré l'échec d'un marqueur particulier. La consigne fournie exige que les échantillons de contrôle aient réussi tous les tests de CQ. Voir les recommandations en matière d'interprétation à la section 6.5.

⁴ Indiquent que l'artefact de pic large connu mesurant entre 83 pb et 90 pb détecté dans le marqueur NR-21 pendant le CQ des données n'est pas lié à l'instabilité. Il faut interpréter tous les échantillons comme étant non valables si un échantillon de contrôle présente un pic large autre que l'artefact connu du marqueur NR-21, et il faut interpréter le ou les marqueurs affectés comme étant non valables si l'on observe un pic large autre que l'artefact connu du NR-21 dans un échantillon patient.

⁵ Quand le CQ de l'identité de l'échantillon patient échoue en raison de l'absence d'un allèle, l'échantillon peut être interprétable d'après les consignes de la section 6.5.3. Autrement, l'échantillon n'est pas valable.

6.3.1 Évaluer la qualité de la taille de tous les échantillons (CQ relatif à la qualité des tailles)

Les mesures de qualité de taille peuvent être fournies par des appareils d'électrophorèse capillaire et/ou affichées dans un logiciel d'analyse de fragments. Les problèmes relatifs à la qualité de la taille sont généralement associés à un échec de l'analyse de l'électrophorèse capillaire et se produisent sur une base monocapillaire (c.-à-d. pas pour chaque capillaire d'une injection). Les échantillons présentant des problèmes de qualité de taille n'afficheront pas (ou peu) de pics de fragment ou ils afficheront des pics de fragment qui s'élargissent (c.-à-d. qui perdent leur résolution) tandis que leur taille augmente (schéma 9). Évaluer la qualité de taille de chaque échantillon et contrôle analysé, car les informations relatives à la taille sont essentielles pour le résultat du test.

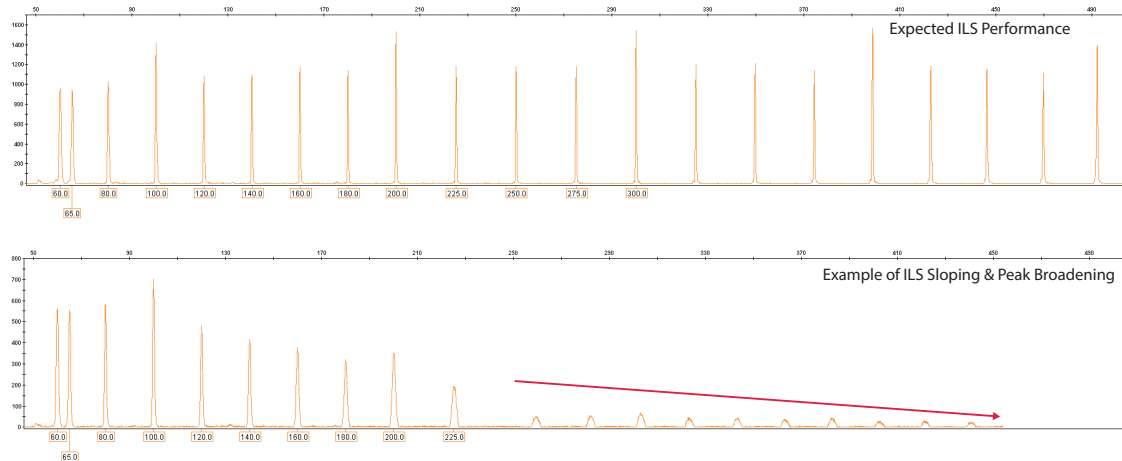
Pour évaluer la qualité de taille, s'assurer que le canal du fluorochrome de l'étalon de taille Size Standard 500 (orange) s'affiche dans le logiciel d'analyse de fragments et montre les profils de pics attendus pour les fragments de l'étalon de taille mesurant entre 60 bp et 300 bp. Le résultat obtenu pour un échantillon patient ou échantillon de contrôle n'est pas valable si l'un des attributs suivants (indiquant une mauvaise qualité de taille) est présent :

- a. Le logiciel de collecte de données d'électrophorèse capillaire ou le logiciel d'analyse de fragments génère un drapeau alertant sur la qualité de la taille.

Remarque : On utilise uniquement les fragments de l'étalon de taille Size Standard 500 mesurant entre 60 bp et 300 bp pour évaluer la taille des marqueurs MSI. Les problèmes de qualité de taille apparents relatifs aux pics de l'étalon de taille Size Standard 500 supérieurs à 300 pb n'affectent pas l'attribution des tailles des fragments.

- b. Un ou plusieurs des 13 fragments de l'étalon de taille Size Standard 500 mesurant entre 60 bp et 300 bp sont mal étiquetés ou ne le sont pas du tout (60 bp, 65 bp, 80 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp et 300 bp). Cela peut se produire en raison d'une forte chute d'un pic à l'autre ou de l'élargissement des pics dans l'étalon de taille. De temps en temps, des pics aberrants sont parfois détectés pendant l'électrophorèse capillaire, ce qui pourrait occasionner une mauvaise identification des pics de l'étalon de taille.

Remarque : Des « pointes » d'électrophorèse capillaire (c.-à-d. des pics de largeur nulle) seront peut-être présentes mais n'interféreront pas avec l'évaluation de la taille des fragments, à moins que le logiciel d'analyse de fragments ne les aient identifiées par erreur comme pics de l'étalon de taille.



161857A

Schéma 9. Le panel du haut affiche les résultats escomptés pour l'étalon de taille Size Standard 500. Dans le panel du bas, on constate des baisses très prononcées et un élargissement des pics, ce qui indique un problème au niveau de la qualité des mesures de taille.

6.3.2 Évaluer la réaction de contrôle négatif d'amplification (CQ du contrôle négatif)

Il faut analyser un contrôle d'amplification négatif en même temps que les échantillons patient. Si l'on détecte des pics de fragment supérieurs au seuil d'analyse dans les canaux de fluorochromes de l'échantillon (bleu, vert et jaune/noir) du contrôle d'amplification négatif, cela indique qu'une contamination a pu se produire. Un contrôle négatif contaminé indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Par conséquent, il faut considérer tous les échantillons patient d'un lot dont l'échantillon de contrôle négatif a échoué comme non valables.

6.3.3 Évaluer les marqueurs de répétition de pentanucléotides de la réaction du contrôle positif pour contrôler son identité (CQ de l'identité du contrôle positif)

Il faut analyser un échantillon de contrôle positif d'amplification (préparé avec du 2800M Control DNA) en même temps que les échantillons patient pour attester de l'intégrité du test (c.-à-d. que les résultats escomptés ont été observés). On évalue le CQ de l'identité du contrôle positif avec les marqueurs Penta D et Penta C. L'échantillon de contrôle positif d'amplification présente deux allèles à chaque marqueur de répétition de pentanucléotides, lesquels sont détectés dans les plages de tailles suivantes (en bp) d'après nos données d'évaluation de la performance (conditions énumérées aux annexes B et C) :

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

Un contrôle négatif qui ne satisfait pas à ces critères indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Par conséquent, tous les échantillons patient d'un lot dont l'échantillon de contrôle positif a échoué devraient être considérés comme non valables.

6.3.4 Évaluer les intensités de pic des résultats hors échelle (CQ de pics hors échelle)

Les appareils d'électrophorèse capillaire ont une portée limitée pour détecter les signaux fluorescents provenant de fragments d'ADN marqués par des fluorochromes. Dans certaines situations, le signal fluorescent provenant des produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System peuvent dépasser la limite supérieure du détecteur. Dans ce cas, l'appareil génère une alerte de pics hors échelle qui s'affichera sous forme de drapeau dans le logiciel d'analyse de fragments. En cas d'intensités de pic hors échelle, le signal peut s'infiltrer dans d'autres canaux de fluorochromes (schéma 10 ; section 6.3.5). Étant donné que les pics d'infiltration ressembleront à ceux du signal d'origine, on peut confondre cette infiltration avec un allèle dans un échantillon normal ou tumoral, ce qui complique l'interprétation du statut MSI. Un échantillon patient ou échantillon de contrôle doit être considéré comme non valable si l'on observe des résultats hors échelle. Les résultats hors échelle observés dans les contrôles positifs d'amplification (A2800M Control DNA) indiquent un problème systémique lors de la préparation ou de l'amplification des réactions du OncoMate™ MSI Dx Analysis System et potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons à tester. Les lots dont un contrôle positif échoue au test CQ de pics hors échelle doivent être interprétés comme non valables et traités conformément aux consignes de la section 9. Évaluer les données des résultats hors échelle dans chaque échantillon analysé et dans le contrôle 2800M d'amplification.

6.3.5 Évaluer tous les marqueurs pour identifier une interférence spectrale (CQ relatif à l'interférence spectrale)

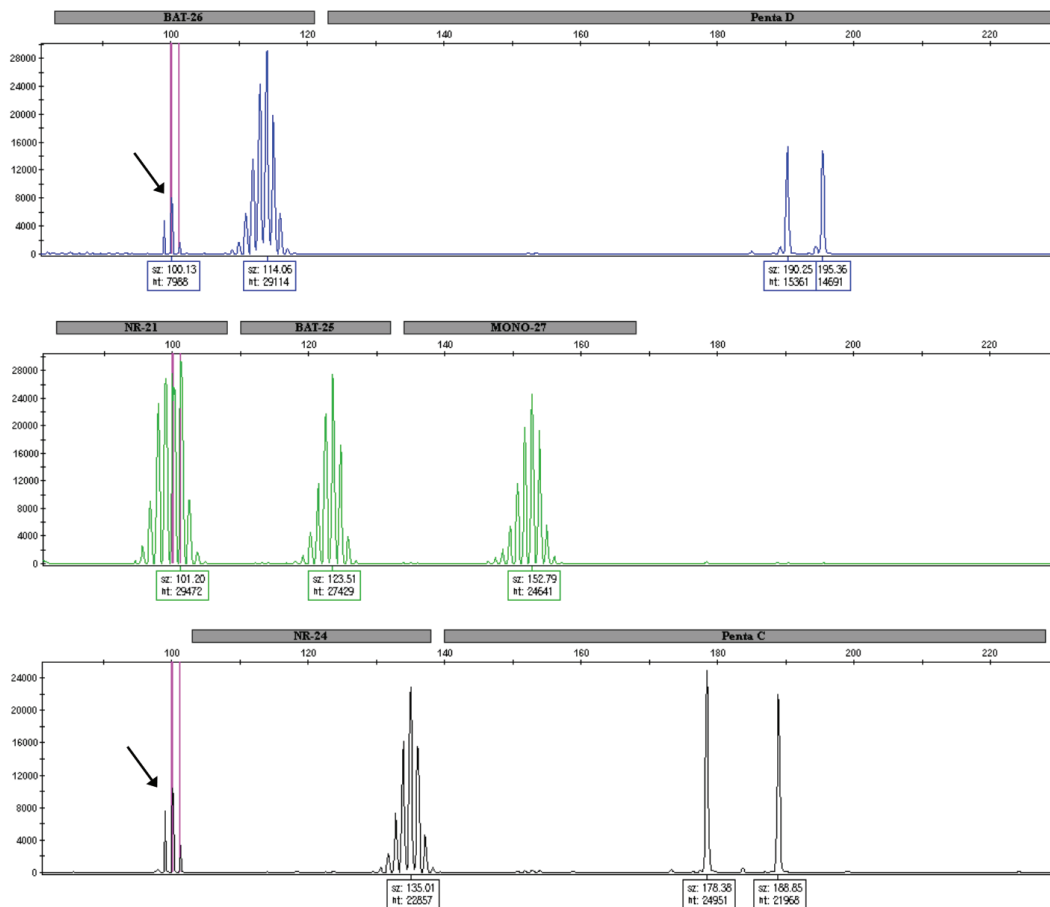
Quand on observe des résultats hors échelle ou que la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire n'est pas adéquate (en raison de modifications apportées à l'optique de l'appareil pendant l'intervention d'un technicien, par ex.), les signaux fluorescents provenant des fragments marqués par des fluorochromes sont parfois détectables en dehors du canal prévu à environ la même taille (en bp) que celle du signal réel. On appelle cela une interférence spectrale ou une infiltration. Lorsqu'il détecte une infiltration dans d'autres canaux de fluorochrome, le logiciel d'analyse des fragments peut afficher une alerte de CQ.

Se reporter au manuel technique du logiciel d'analyse de fragments pour régler les paramètres afin que l'appareil détecte toute interférence spectrale. Les paramètres utilisés pendant l'évaluation du OncoMate™ MSI Dx Analysis System sont indiqués à l'annexe C.

Étant donné que les pics ressembleront dans leur ensemble à ceux du signal d'origine, on peut confondre cette infiltration avec un allèle dans un échantillon normal ou tumoral, ce qui complique l'interprétation du statut MSI. La présence de signaux d'infiltration dans les contrôles positifs d'amplification (2800M) indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons à tester. Pour ces raisons, les échantillons patient ou échantillons de contrôle concernés doivent être considérés comme non valables, si l'on constate une infiltration supérieure au seuil d'analyse. Évaluer les données d'infiltration de chaque échantillon patient analysé et du contrôle positif d'amplification. Pour identifier la présence éventuelle de pics d'infiltration dans les échantillons, afficher tous les canaux de fluorochrome qui figurent sur le même tracé (schéma 10). Déterminer si des pics de taille identique sont présents dans deux ou plusieurs canaux de fluorochrome. Pour être authentiques, les pics d'un canal de fluorochrome doivent présenter une intensité considérablement plus élevée que celle des pics d'infiltration du ou des autres canaux. Pour les fragments du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, il est possible de constater une infiltration présentant les caractéristiques suivantes :

- a. Les pics du marqueur BAT-26 sont observables dans le panel du marqueur NR-21 ou du marqueur BAT-25.
- b. Les pics du marqueur Penta D sont observables dans le panel du marqueur BAT-25 ou du marqueur MONO-27.
- c. Les pics du marqueur NR-21 sont observables dans le panel du marqueur BAT-26 ou du marqueur NR-24.
- d. Les pics du marqueur BAT-25 sont observables dans le panel du marqueur BAT-26, du marqueur Penta D ou du marqueur NR-24.
- e. Les pics du marqueur MONO-27 sont observables dans le panel du marqueur Penta D, du marqueur NR-24 ou du marqueur Penta C.
- f. Les pics du marqueur NR-24 sont observables dans le panel du marqueur NR-21, du marqueur BAT-25 ou du marqueur MONO-27.
- g. Les pics du marqueur Penta C sont observables dans le panel du marqueur MONO-27.

Dans certaines situations, les pics authentiques sont alignés sur tous les canaux de fluorochromes et donnent l'impression d'une infiltration. Dans ces cas, il faut procéder à nouveau à la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire et répéter le test pour confirmer la fiabilité des données et l'interprétation du statut MSI qui en découle.



16186TA

Schéma 10. Échantillon de tissu hors échelle, avec infiltration du signal bien visible entre les canaux de fluorochrome.

Les pics du marqueur NR-21 dépassent la limite de détection de l'appareil d'électrophorèse capillaire, générant ainsi une alerte « hors échelle » et un pic d'infiltration de forme similaire chez les autres marqueurs. **Panel A.** Marqueurs du canal bleu ; mise en évidence d'un groupe de pics de signal du marqueur NR-21 infiltrant le marqueur BAT-26. **Panel B.** Marqueurs du canal vert ; mise en évidence des pics de fragment hors échelle du marqueur NR-21. **Panel C.** Marqueurs du canal jaune/noir – Les pics d'infiltration du marqueur NR-21 pénétrant ce canal sortent du panel.

6.3.6 Évaluer tous les marqueurs pour détecter les pics larges (CQ relatif aux pics larges)

Des pics de fragment larges sont parfois observés dans le OncoMate™ MSI Dx Analysis System et qualifiés d'allèles. Ces pics montent et descendent légèrement et s'étendent sur plusieurs paires de bases ; ils se distinguent facilement des véritables pics de fragments, qui eux montent et descendent en flèche sur une largeur de 1 à 2 pb. On peut constater la présence sporadique de pics larges suite à une amplification par PCR ou analyse par électrophorèse capillaire anormale. On observe souvent un artefact d'amplification connu se manifestant par un pic large mesurant entre 83 bp et 90 bp dans le marqueur NR-21 du OncoMate™ MSI Dx Analysis System (voir la section 6.2 pour plus de détails). Lorsqu'il détectera des pics larges, le logiciel d'analyse des fragments générera peut-être une alerte (drapeau) de CQ.

Se reporter au manuel technique du logiciel d'analyse de fragments pour régler les paramètres afin que l'appareil détecte les pics larges. Les paramètres utilisés pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System sont indiqués à l'annexe C (section 11.3).

Inspecter les échantillons patient et échantillons de contrôle au niveau de chaque marqueur pour déceler les pics larges qualifiés d'allèles. Un pic large au niveau du marqueur NR-21 mesurant entre 83 bp et 90 bp n'indique pas une instabilité des microsatellites et le fait de l'avoir détecté ne signifie pas que le CQ relatif aux pics larges a échoué. Lorsqu'un pic large est détecté au niveau d'un ou de plusieurs marqueurs, la qualité des données est diminuée. D'après les consignes de la section 6.5, l'interprétation des données des marqueurs non affectés peut encore être possible. Des pics larges présents dans un ou plusieurs échantillons de contrôle indiquent potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les lots dont un échantillon de contrôle échoue au test CQ relatif aux pics larges doivent être interprétés comme non valables et traités conformément aux consignes de la section 9.

6.3.7 Évaluer tous les marqueurs pour l'amplification des allèles (CQ relatif à l'amplification des allèles)

Inspecter les échantillons patient et les contrôles positifs 2800M au niveau de chaque marqueur afin d'évaluer si un pic de fragment authentique est présent au-dessus du seuil d'analyse (voir les sections 3.9 et 7.5). Lorsqu'aucun allèle n'est détecté au niveau d'un ou de plusieurs marqueurs, la qualité des données des échantillons est diminuée. Documenter les marqueurs pour lesquels le CQ relatif à l'amplification des allèles a échoué. D'après les consignes de la section 6.3, l'interprétation des données des marqueurs non affectés peut encore être possible. **Remarque :** Il faut qu'au moins 1 allèle ait été détecté dans l'échantillon normal et dans l'échantillon tumoral pour pouvoir interpréter un marqueur de répétition de mononucléotides. L'absence d'allèles dans les contrôles positifs d'amplification (2800M) indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les lots dont un échantillon de contrôle positif échoue au test CQ relatif à l'amplification des allèles doivent être interprétés comme non valables et traités conformément aux consignes de la section 9.

6.3.8 Évaluer le contrôle positif d'amplification et les échantillons patient normaux pour détecter une éventuelle contamination de l'ADN (CQ relatif à la contamination de l'ADN)

L'analyse du nombre d'allèles détectés dans les marqueurs de répétition de pentanucléotides peut parfois fournir des informations sur la contamination des échantillons par des sources extérieures d'ADN humain. Compter le nombre d'allèles identifiés pour chaque marqueur de répétition de pentanucléotides dans le contrôle positif d'amplification et les échantillons patient normaux. Le CQ relatif à la contamination de l'ADN échoue quand trois allèles ou plus sont détectés au niveau du marqueur Penta C ou Penta D. L'instabilité génomique associée à certaines tumeurs peut entraîner la présence de plus de deux allèles dans l'échantillon tumoral. Par conséquent, l'évaluation des échantillons tumoraux patient (par le CQ relatif à la contamination de l'ADN) n'est pas informative. Un échec de l'échantillon de contrôle positif d'amplification (2800M) indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les échantillons des lots dont l'échantillon de contrôle positif échoue au test de CQ relatif à la contamination de l'ADN doivent tous être interprétés comme non valables et traités conformément aux consignes de la section 9. Les échantillons patient normaux qui échouent au test de CQ relatif à la contamination de l'ADN devraient être considérés comme non valables et traités conformément aux consignes de la section 9.

6.3.9 Évaluer les marqueurs de répétition de pentanucléotides des échantillons patient pour contrôler leur identité (CQ de l'identité de l'échantillon patient)

Comparer les allèles de chaque marqueur de répétition de pentanucléotides pour confirmer que les échantillons normaux et tumoraux proviennent du même patient. Le CQ de l'identité de l'échantillon patient réussit lorsque tous les allèles identifiés dans l'échantillon normal sont également présents dans l'échantillon tumoral. Dans les cas d'instabilité génomique associée à certaines tumeurs, les allèles de l'échantillon tumoral sont parfois plus nombreux ou moins nombreux que dans l'échantillon normal. La présence d'allèles supplémentaires dans l'échantillon tumoral a été observée et n'occasionne pas l'échec du CQ de l'identité de l'échantillon patient. Des allèles supplémentaires dans l'échantillon tumoral au niveau des marqueurs Penta n'indiquent pas une MSI. Par contre, s'il manque un allèle dans l'échantillon tumoral, cela peut indiquer que l'échantillon a été substitué ou qu'il y a une perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau du marqueur (voir la section 6.5.3). Les paires d'échantillons qui échouent au test de CQ de l'identité de l'échantillon patient car il manque un allèle dans l'échantillon tumoral peuvent encore être interprétées conformément aux consignes de la section 6.5.3. Les paires d'échantillons qui échouent au test de CQ de l'identité de l'échantillon patient pour d'autres raisons doivent être considérées comme non valables et traitées conformément aux consignes de la section 9. Le CQ de l'identité de l'échantillon patient n'implique pas d'évaluer les contrôles positifs et négatifs.

6.3.10 Évaluer les marqueurs de répétition de mononucléotides des échantillons tumoraux pour déterminer leur signal (CQ du signal de l'échantillon tumoral)

Pour chaque marqueur de répétition de mononucléotides, lorsqu'aucun nouvel allèle n'a été identifié dans l'échantillon tumoral par rapport à l'échantillon normal, le marqueur est interprété comme stable. Cependant, l'allèle normal (« de référence ») de l'échantillon tumoral doit être présent à une intensité suffisante, en fonction du contenu tumoral de l'échantillon, pour s'assurer de pouvoir détecter tout nouvel allèle supérieur au seuil d'analyse. Par conséquent, l'intensité des pics au niveau de chaque marqueur de répétition de mononucléotides apparemment stable doit être inspectée pour déterminer si l'intensité de l'allèle est suffisante pour garantir la sensibilité du test et détecter de nouveaux allèles.

Pour l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, nous avons déterminé que le seuil d'analyse était de 175 RFU avec un contenu tumoral minimal de 20 %, correspondant à une fraction tumorale de 0,2. Pour assurer la sensibilité du test, nous avons utilisé la formule suivante pour déterminer que l'intensité minimale requise pour le pic de l'allèle normal doit s'élever à 700 RFU dans les marqueurs de répétition de mononucléotides apparemment stables des échantillons tumoraux :

$$\text{Intensité du signal de l'échantillon tumoral (RFU)} \geq \text{Seuil d'analyse} \times \frac{1}{\text{Fraction tumorale minimale}} \times (1 - \text{Fraction tumorale minimale})$$

À une intensité de pic minimale de 700 RFU, un nouvel allèle présent dans 20 % (fraction tumorale de 0,2) de l'échantillon total aurait une hauteur de pic prévue de 175 RFU (c.-à-d. 175 RFU représente 20 % du signal total de 875 RFU et 700 RFU représente 80 % du signal total de 875 RFU). Garantissant ainsi que l'intensité du signal est suffisante pour déterminer de manière fiable la taille d'un marqueur donné dans les échantillons dont le contenu tumoral est ≥ 20 %. Documenter les marqueurs qui échouent au test de CQ du signal de l'échantillon tumoral. D'après les consignes de la section 6.5, l'interprétation des données des marqueurs non affectés peut encore être possible. Le CQ du signal de l'échantillon tumoral n'implique pas d'évaluer les contrôles positifs et négatifs.

6.4 Détermination de la stabilité des marqueurs de répétition de mononucleotides

L'analyse des marqueurs de répétition de mononucléotides des échantillons normaux et tumoraux appariés détermine la stabilité des marqueurs, ce qui renseigne sur le statut MSI de la tumeur. On évalue la stabilité marqueur après marqueur et on identifie l'instabilité par la présence d'un ou de plusieurs nouveaux allèles microsatellites dans l'échantillon tumoral par rapport à l'échantillon normal du même patient. Dans certaines tumeurs, on constate parfois de subtiles altérations des allèles et il est parfois impossible pour le logiciel d'analyse de fragments d'identifier de nouveaux allèles distincts ; pour ces échantillons, on peut identifier l'instabilité en comparant visuellement les électrophorégrammes pour détecter les différences. Dans d'autres tumeurs, comme celles des patients atteints de cancer colorectal MSI-H, les profils microsatellites sont fortement altérés et de nouveaux allèles distincts avec des pics de « glissement » adjacents à intensité décroissante sont présents. Répéter l'analyse d'un échantillon dont le contenu tumoral a augmenté et/ou dont la ou les durées d'injection d'électrophorèse capillaire différent peut être informatif lorsque la stabilité des marqueurs est équivoque ou indéterminée (Guedes, 2017 ; Wang, 2017 ; Boyle, 2014). Le processus de détermination de la stabilité des marqueurs est résumé au schéma 11. Le tableau 6 résume les résultats possibles lorsque l'on détermine la stabilité des marqueurs de répétition de mononucléotides. On ne peut pas déterminer la stabilité des marqueurs des échantillons patient qui ont été identifiés comme non valables en raison d'un grave échec du CQ des données (section 6.3).

Lors de l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, nous avons utilisé un algorithme simple pour déterminer la stabilité des marqueurs : Pour chacun des cinq marqueurs de répétition de mononucléotides de l'échantillon normal et de l'échantillon tumoral du patient, c'est le plus petit allèle identifié qui a été sélectionné comme l'allèle d'intérêt pour les comparaisons ultérieures. La différence de taille entre les allèles d'intérêt des échantillons normaux et tumoraux a été calculée pour déterminer la stabilité des marqueurs. Lorsque cette différence était ≥ 3 bp ($\geq 2,75$ bp dans la pratique pour tenir compte de la précision de l'appareil d'électrophorèse capillaire en termes de mesure de taille), le marqueur a été interprété comme instable.

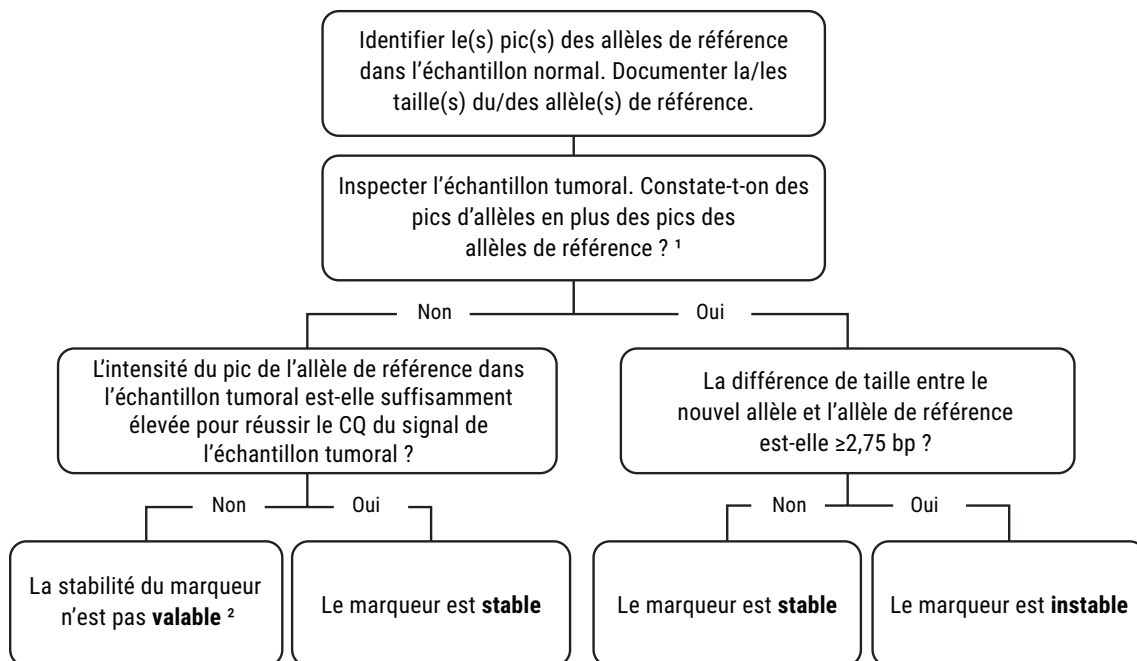
Tableau 6. On détermine les statuts de stabilité des marqueurs de répétition de mononucleotides en comparant les allèles présents dans les échantillons normaux et tumoraux.

Détermination de la stabilité des marqueurs

La valeur de stabilité attribuée à chaque marqueur pour l'échantillon

Valeur	Description
Stable	Aucune instabilité des microsatellites n'a été détectée au niveau du marqueur de répétition de mononucléotides. Soit aucun nouvel allèle n'a été détecté dans l'échantillon tumoral, soit la différence de taille entre un nouvel allèle tumoral et l'allèle de référence normal était négligeable ($< 2,75$ bp).
Instable	Une instabilité des microsatellites a été détectée au niveau du marqueur de répétition de mononucléotides. Soit un nouvel allèle a été détecté dans l'échantillon tumoral, soit la différence de taille entre un nouvel allèle tumoral et l'allèle de référence normal était significative ($\geq 2,75$ bp).
Non valable	L'instabilité des microsatellites n'a pas pu être évaluée pour le marqueur de répétition de mononucléotides. La qualité des données de l'échantillon n'était pas acceptable en raison d'un échec important du contrôle de la qualité (voir la section 6.3).

Pour chaque marqueur de répétition de mononucléotides qui réussit le CQ :



1. Les échantillons tumoraux sont souvent constitués de cellules normales et de cellules tumorales ; l'allèle de référence normal est fréquemment présent dans l'échantillon tumoral.

2. Voir la section 9 Dépannage pour plus d'informations.

16187MA

Schéma 11. Consignes d'ordre général pour l'évaluation de la stabilité des marqueurs de répétition de mononucléotides des échantillons patient. Suivre l'organigramme pour chacun des marqueurs de répétition de mononucléotides qui satisfont aux exigences de CQ des données spécifiées à la section 6.3. Documenter la stabilité de chaque marqueur, puis aller à la section 6.5 – Interprétation du statut MSI d'une tumeur. **Remarque :** Pour qu'un marqueur de répétition de mononucléotides puisse être interprété, il doit réussir toutes les vérifications de CQ dans les échantillons normaux et tumoraux.

6.5 Interprétation du statut MSI d'une tumeur

6.5.1 Résumé

Le processus d'interprétation du statut MSI d'un échantillon selon les valeurs de stabilité des marqueurs établies par le OncoMate™ MSI Dx Analysis System est résumé au schéma 12. Le tableau 7 résume les critères d'évaluation pour l'interprétation du statut MSI de l'échantillon tumoral. Cette méthode suit les règles consensuelles établies lors de l'atelier de l'Institut national américain du cancer [US National Cancer Institute] sur l'instabilité des microsatellites (Boland, 1998). Lorsqu'il n'y a pas de grave échec du contrôle de la qualité, on interprète le statut MSI de l'échantillon comme suit :

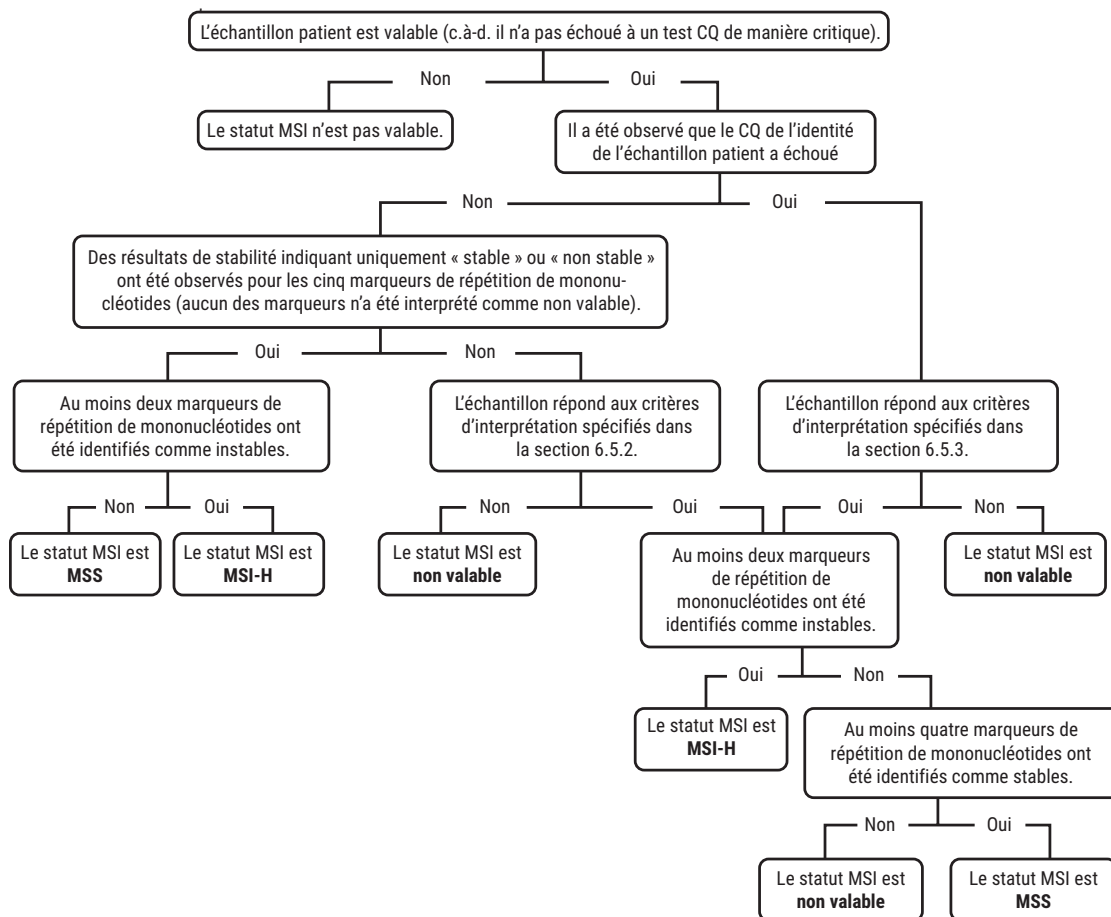
Un échantillon tumoral est considéré comme MSI-H lorsqu'au moins deux marqueurs de répétition de mononucléotides sont interprétés comme étant instables. Un échantillon tumoral est considéré comme MSS lorsque moins de deux marqueurs de répétition de mononucléotides sont interprétés comme étant instables (Hampel, 2008 ; Boland, 2004).

Déterminer le statut MSI reste possible quand les résultats non valables obtenus concernent un sous-ensemble de marqueurs (voir la section 6.5.2) ou quand le CQ de l'identité de l'échantillon patient échoue (voir la section 6.5.3). Les consignes pour interpréter ce type d'échantillon figurent ci-dessous. Les échantillons présentant moins de deux marqueurs de répétition de mononucléotides valables ne peuvent pas être interprétés et doivent être traités conformément aux consignes de la section 9.

Tableau 7. Conclusion concernant le statut MSI de la tumeur d'après la somme des résultats de stabilité des marqueurs.

Valeur	Description
MSS	MSS (microsatellites stables) indique que moins de deux marqueurs de répétition de mononucléotides ont été identifiés comme instables.
MSI-H	MSI-H (instabilité des microsatellites élevée) indique qu'au moins deux marqueurs de répétition de mononucléotides ont été identifiés comme étant instables.
Non valable	« Non valable » signifie que la qualité des données de l'échantillon n'était pas acceptable en raison d'un échec important du contrôle de la qualité (voir le tableau 5). On ne peut pas déterminer le statut MSI à partir de ces données. Lorsqu'un lot a échoué au CQ des données en raison d'un problème au niveau du contrôle positif ou négatif d'amplification, tous les échantillons de ce lot doivent être interprétés comme non valables. La section Dépannage de ce manuel contient des consignes sur la résolution des échecs de CQ occasionnant des résultats non valables.

Interprétation du statut MSI de chaque échantillon patient :



16188MA

Schéma 12. Consignes d'ordre général pour déterminer le statut MSI d'un échantillon tumoral. Suivre l'organigramme pour chaque échantillon qui réussit le CQ des données.

6.5.2 Interprétation du statut MSI lorsqu'un sous-ensemble de marqueurs présente des résultats de stabilité non valables

Lorsque l'intensité des pics d'allèles des marqueurs de répétition de mononucléotides est trop faible pour évaluer les données, les échantillons échoueront soit au CQ du signal de l'échantillon tumoral soit au CQ relatif à l'amplification des allèles et afficheront un statut de stabilité des marqueurs non valable. Lorsqu'un pic large interfère avec l'évaluation de la taille des pics d'allèles, l'échantillon échouera au CQ relatif aux pics larges et affichera un statut de stabilité des marqueurs non valable.

L'interprétation du statut MSI reste parfois possible pour un échantillon patient qui présente des résultats de stabilité non valables au niveau d'un sous-ensemble de marqueurs de répétition de mononucléotides si les conditions suivantes sont réunies :

1. Il n'a pas été possible de corriger les faibles hauteurs de pic des marqueurs en a) augmentant la teneur en ADN dans la réaction d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, ou b) en réanalysant une section de tissu FFPE différente.
2. Il n'a pas été observé d'échec de CQ au niveau de l'un des marqueurs de répétition de pentanucléotides.
3. Les seuls contrôles de qualité des données qui ont échoué sont le CQ du signal de l'échantillon tumoral, le CQ relatif à l'amplification des allèles ou le CQ relatif aux pics larges.
4. Une valeur stable ou instable a pu être établie pour deux marqueurs de répétition de mononucléotides ou plus.

Si ces conditions sont remplies, on peut interpréter l'échantillon avec les autres données de stabilité valables en suivant les consignes suivantes (Boland, 1998) :

1. Si au moins deux marqueurs de répétition de mononucléotides sont instables, donner le statut MSI-H à l'échantillon tumoral.
2. Si au moins quatre marqueurs de répétition de mononucléotides sont stables, donner le statut MSS à l'échantillon tumoral.
3. Autrement, l'échantillon ne peut pas être interprété. Le statut MSI de l'échantillon ne sera pas valable.

6.5.3 Interprétation du statut MSI lorsqu'un échantillon patient échoue au CQ d'identité

Dans les échantillons tumoraux, les marqueurs de répétition de pentanucléotides peuvent perdre des allèles ou présenter des allèles supplémentaires, ce qui complique l'interprétation de l'identité chez les échantillons normaux. Les événements génétiques communément observés dans les tissus tumoraux sont, entre autres, la LOH (perte d'hétérozygotie) et l'instabilité génomique généralisée, lesquelles peuvent interférer avec l'authentification des échantillons (c.-à-d. la confirmation de l'identité entre les échantillons normaux et les échantillons tumoraux appariés). Les marqueurs de répétition de pentanucléotides peuvent présenter un nombre différent d'allèles dans un échantillon tumoral par rapport à l'échantillon normal correspondant. La présence d'allèles supplémentaires dans un échantillon tumoral n'entraîne pas l'échec du CQ des données.

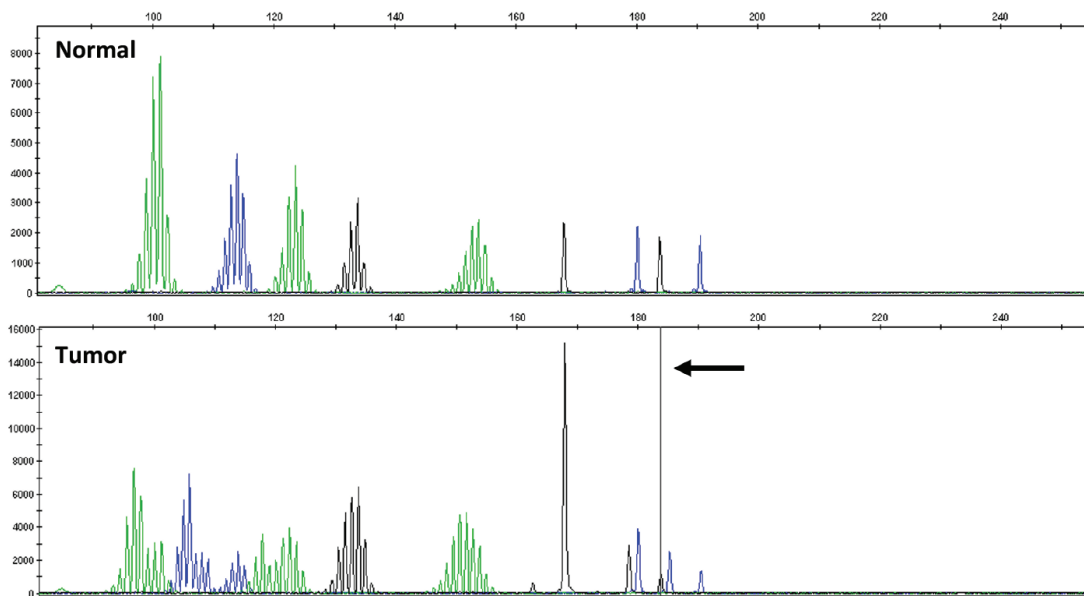
Par contre, les cas de déséquilibre allélique prononcé (p. ex. perte d'hétérozygotie, LOH) peuvent donner lieu à la présence d'un allèle pentanucléotidique dans un échantillon normal mais qui n'est pas qualifié d'allèle dans un échantillon tumoral. On observe un déséquilibre allélique grave lorsque l'un des allèles pentanucléotidiques normaux se perd dans la tumeur (c.-à-d. qu'il a considérablement diminué en termes de hauteur de pic et n'est pas identifié comme un allèle). Cet état peut occasionner l'échec manifeste du CQ de l'identité de l'échantillon patient. Pour confirmer la présence d'un allèle normal « perdu » qui dépasserait le seuil d'analyse et aurait simplement été filtré par l'algorithme de qualification des allèles du logiciel, ouvrir le fichier échantillon dans le logiciel d'analyse de fragments et placer le curseur sur le pic « perdu » dans l'électrophorégramme de l'échantillon tumoral. Lorsque le curseur est sur un pic potentiellement « perdu » dans le logiciel GeneMapper®, on voit apparaître une ligne noire verticale indiquant que le pic dépassait le seuil d'analyse, mais qu'il a été filtré et n'a donc pas été identifié en tant qu'allèle (schéma 13). Autre alternative : on peut zoomer sur un pic potentiellement « perdu » pour s'assurer que le pic perdu est au-dessus du seuil d'analyse. Si le logiciel d'analyse de fragments sélectionné ne prend pas en charge cette fonctionnalité, vérifier que la hauteur du pic de l'allèle perdu est supérieure au seuil d'analyse.

L'interprétation du statut MSI reste parfois possible pour un échantillon patient qui a manifestement échoué au CQ de l'identité si les conditions suivantes sont réunies :

1. L'échec du contrôle de la qualité a été observé au niveau d'un seul marqueur de répétition de pentanucléotides (c.-à-d. Penta C ou Penta D, pas les deux).
2. L'allèle normal « perdu » est présent dans l'échantillon tumoral au-dessus du seuil d'analyse, mais l'algorithme de qualification des allèles du logiciel d'analyse de fragments l'a filtré comme « glissement » car un autre allèle dont la hauteur est beaucoup plus grande est présent dans le même panel.
3. Il n'a pas été observé d'échec de CQ au niveau des marqueurs de répétition de mononucléotides.

Si ces conditions sont remplies, on peut interpréter les données à l'aide des consignes suivantes :

1. Si au moins deux marqueurs de répétition de mononucléotides sont instables, donner le statut MSI-H l'échantillon tumoral.
2. Si au moins quatre marqueurs de répétition de mononucléotides sont stables, donner le statut MSS à l'échantillon tumoral.



16189TA

Schéma 13. Un exemple de déséquilibre allélique prononcé. En cas de déséquilibre allélique prononcé dans les marqueurs de répétition de pentanucléotides, lorsque l'on place le curseur sur un pic normal « perdu » dans l'électrophorégramme de l'échantillon tumoral, une ligne noire verticale s'affiche si ce pic est présent et dépasse le seuil d'analyse, mais qu'il a été filtré comme « glissement » dû à la hauteur beaucoup plus élevée de l'allèle de 168 bp dans ce même panel.

7. Contrôles de la qualité des tests

7.1 Calibration spectrale

Pendant l'électrophorèse capillaire, les produits d'amplification du OncoMate™ MSI Dx Analysis System marqués par des fluorochromes sont séparés en fonction de leur taille et détectés. Avant l'analyse, on calibre l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné avec des matrices étalon de manière à ce qu'il distingue les fluorochromes spécifiquement utilisés pendant le test. La matrice étalon OncoMate™ 5C (réf. cat. Promega MD3580) se compose de fragments d'ADN marqués de cinq fluorochromes différents (fluorescéine, JOE, TMR-ET, CXR-ET et WEN) dans un même tube. Effectuer une calibration spectrale conformément aux paramètres généraux fournis à l'annexe A (section 11.1). Une fois généré, le fichier de calibration spectrale est automatiquement appliqué pendant la détection de l'échantillon pour tenir compte du chevauchement spectral entre les fluorochromes et pour séparer les signaux bruts fluorescents en signaux de fluorochrome individuels.

7.2 Échantillon de tissu normal apparié

Les marqueurs de répétition de mononucléotides peuvent manifester une hétérozygotie ou une variation de la longueur des allèles du tissu normal entre les individus. (Bacher, 2004). Pour tenir compte de ces variations dans les allèles normaux, un échantillon de tissu normal apparié doit être traité en parallèle avec chaque échantillon tumoral. De plus, il peut être important d'examiner l'échantillon de tissu normal lors de l'évaluation de l'échantillon tumoral pour détecter d'éventuelles subtiles altérations dans la longueur des allèles. Un échantillon tumoral se compose généralement d'un mélange de cellules normales et de cellules tumorales. Le ou les nouveaux allèles tumoraux peuvent parfois chevaucher les pics de « glissement » des cellules normales de l'échantillon tumoral, et il peut être nécessaire de les comparer directement avec ceux du tissu normal pour interpréter les données. Si, pour une raison quelconque, il est nécessaire de réanalyser une tumeur ou un échantillon normal, il faut également réanalyser la tumeur ou l'échantillon normal apparié(e) pour tenir compte des potentielles variations d'un cycle à l'autre.

7.3 Contrôles positifs et négatifs

Les réactions d'amplification des contrôles positifs et négatifs (sans matrice) effectuée avec le 2800M Control DNA et la Water, Amplification Grade, respectivement, doivent être analysées en même temps que les échantillons patient pour vérifier la performance du test. Il faut inclure au moins une réaction d'amplification du 2800M Control DNA et une réaction d'amplification de contrôle négatif dans chaque plaque d'échantillons patient. La réaction du contrôle négatif est analysée pour s'assurer qu'aucune amplification inattendue n'est survenue dans les réactions sans matrice. Une amplification inattendue dans une réaction de contrôle négatif indique une contamination de l'ADN, ce qui invalide le résultat de l'analyse. Les contrôles négatifs ne devraient pas comporter de pics amplifiés supérieurs au seuil d'analyse. La réaction du contrôle positif est analysée pour démontrer que la chimie de l'amplification a fonctionné comme prévu. Un contrôle positif produisant des résultats inattendus peut indiquer que l'amplification est sous-optimale ou qu'elle a échoué. Voir le tableau 8 pour connaître les résultats attendus concernant le 2800M Control DNA.

Tableau 8. Résultats attendus avec 1 ng de 2800M Control DNA.

Nom du marqueur	Allèles 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

¹Les tailles des allèles ont été déterminées à l'aide de l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx, avec un polymère POP-7® et un réseau capillaire de 50 cm. Les tailles déterminées par d'autres appareils ou en utilisant des configurations de consommables différentes peuvent varier légèrement.

²La performance des appareils d'électrophorèse capillaire varie d'un appareil à l'autre et leur performance varie d'un jour à l'autre, ce qui peut occasionner une différence d'environ ± 1 bp dans les tailles d'allèle attendues pour le 2800M Control DNA.

7.4 Étalons d'électrophorèse capillaire

Tous les échantillons et contrôles analysés doivent contenir l'étalon de taille Size Standard 500. L'étalon de taille Size Standard 500 contient une série de 21 fragments d'ADN dont les longueurs sont connues (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500 bp). Chaque fragment est marqué par le fluorochrome WEN et est détecté séparément (en tant que quatrième couleur, le orange) en présence des produits amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System pendant l'électrophorèse capillaire. On utilise l'étalon de taille Size Standard 500 pour attribuer des tailles aux produits amplifiés de chaque échantillon et de chaque contrôle à l'aide de la méthode de Southern Blot (Southern, 1979). L'étalon de taille contrôle les variations entre les capillaires pour la précision des mesures pendant l'électrophorèse capillaire et permet de comparer directement les échantillons sur l'ensemble du cycle de l'électrophorèse capillaire. Seuls les fragments entre 60 bp et 300 bp sont analysés à l'aide du logiciel d'analyse de fragments sélectionné.

7.5 Seuil d'analyse

Pour pouvoir se fier à l'interprétation du statut MSI, il faut établir un seuil d'analyse et l'appliquer pendant l'analyse des données effectuée avec le logiciel d'analyse de fragments. Il existe plusieurs méthodes pour établir un seuil d'analyse approprié ; on peut les trouver dans la littérature publiée (Bregu, 2013, par ex.). Pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System, nous avons déterminé que le seuil d'analyse est de 175 RFU pour tous les canaux de fluorochrome, en utilisant la méthode de la limite supérieure qui se base sur la régression linéaire des intensités de pics générées à partir d'échantillons contenant différentes teneurs en ADN (Bregu, 2013).

8. Limites spécifiques

Le contenu tumoral des échantillons tumoraux peut affecter la capacité du logiciel de détermination des tailles de fragments à identifier un allèle. D'après une caractérisation pathologique standard, le contenu tumoral doit être $\geq 20\%$ et les cellules nucléées doivent être suffisamment abondantes. On ne peut pas utiliser les échantillons tumoraux qui ne répondent pas à ces critères avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Le OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été évalué avec de l'ADN purifié provenant d'échantillons de tissu intestinal FFPE à l'aide de l'appareil Maxwell® CSC et du kit Maxwell® CSC FFPE DNA, suivi de l'analyse des produits d'amplification avec l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx et la version 5.0 du logiciel GeneMapper®. Avant de changer de méthode d'extraction d'ADN, d'appareil d'électrophorèse capillaire, de logiciel d'analyse de fragments ou de méthode d'analyse, l'utilisateur doit déterminer si ces méthodes et outils sont compatibles avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Le logiciel de détermination des tailles des fragments a diverses capacités d'identifier un allèle tumoral modifié ou la présence de marqueurs microsatellites. Pour une interprétation exacte, comparer l'échantillon tumoral à un échantillon de tissu normal appartenant au même patient.

Les locus microsatellites compris dans le système sont quasi-monomorphes. Dans de rares cas, des allèles hétérozygotes ont été observés. Pour une interprétation exacte, comparer l'échantillon tumoral avec un échantillon de tissu normal appartenant au même patient.

Les appareils et accessoires utilisés avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System doivent être entretenus conformément aux recommandations de leur fabricant et répondre aux critères d'utilisation établis pour ce produit.

9. Dépannage

Pour toute question qui n'est pas abordée ici, consulter le mode d'emploi de l'appareil ou de l'accessoire concerné, ou contacter la filiale ou le distributeur local(e) de Promega. Coordonnées consultables sur : **www.promega.com** ou par courriel : **genetic@promega.com**

Symptômes

Soit les fragments de l'étalon de taille Size Standard 500 étaient de faible résolution, soit il y a moins de fragments que prévu ou soit les intensités de pic sont faibles, donnant lieu à l'échec du CQ relatif à la qualité des tailles (les amplicons peuvent également être affectés).

Causes et commentaires

Présence de bulles dans le système fluidique. Suivre la procédure du fabricant de l'appareil pour éliminer les bulles dans le système fluidique de l'appareil, puis refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les contrôles positifs et négatifs.

Présence de contaminants ou de dépôts cristallins dans le polymère. Lorsqu'il faut rajouter du polymère, s'assurer qu'il est porté à température ambiante conformément aux consignes du fabricant. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les contrôles positifs et négatifs.

Un ou plusieurs capillaires étaient bloqués. Re-remplir le réseau capillaire et refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les contrôles positifs et négatifs. Il sera peut-être nécessaire d'installer un nouveau réseau capillaire.

L'étalon de taille Size Standard 500 n'a pas été ajouté au cocktail de chargement d'électrophorèse capillaire. Préparer à nouveau du cocktail de chargement d'électrophorèse capillaire en y ajoutant l'étalon de taille Size Standard 500 et refaire l'électrophorèse capillaire pour tous les échantillons et contrôles.

Les extrémités des capillaires n'étaient pas en contact avec le cocktail de chargement. S'assurer que chacun des puits (réservés) de la plaque contient 11 µl du mélange cocktail-échantillon et que la plaque a été brièvement centrifugée avant de démarrer le cycle d'électrophorèse capillaire. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les contrôles positifs et négatifs. Examiner l'électrophorégramme pour déterminer ce qui a déclenché une alerte du CQ relatif à la qualité des tailles.

Symptômes

Causes et commentaires

Le cycle d'électrophorèse capillaire n'a pas démarré quand il le devait.

Présence de bulles dans le système fluidique de l'appareil d'électrophorèse capillaire. Éliminer les bulles conformément aux consignes du fabricant. Redémarrer le cycle d'électrophorèse capillaire.

Une erreur s'est produite au niveau de l'ordinateur. Redémarrer l'appareil d'électrophorèse capillaire et son ordinateur conformément aux consignes du fabricant, puis redémarrer le cycle d'électrophorèse capillaire.

Un ou plusieurs des consommables de l'appareil étaient périmés ou ont atteint la limite d'échantillonnage. Remplacer le ou les consommables périmés ou usés, puis redémarrer le cycle d'électrophorèse capillaire.

Des pics inattendus ont été détectés dans le canal de fluorochrome de l'étalon de taille Size Standard 500, ce qui a entraîné l'échec du CQ relatif à la qualité des tailles.

Artefacts liés à l'électrophorèse capillaire. On peut observer des pics aberrants pendant l'électrophorèse capillaire. Lorsque, en cas d'échec du CQ relatif à la qualité des tailles, ces pics affectent le canal orange, cela peut obscurcir les pics de l'étalon de taille Size Standard 500 ou bien le logiciel d'analyse des fragments peut attribuer des tailles inexactes. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les contrôles positifs et négatifs. Remplacer les consommables d'électrophorèse capillaire si le problème persiste. Examiner l'électrophorégramme pour déterminer ce qui a déclenché une alerte de CQ relatif à la qualité des tailles.

Une mauvaise amplification ou un déséquilibre de l'intensité des allèles d'un marqueur à l'autre a été observé dans la réaction d'amplification du 2800M Control DNA (les échantillons pourraient également être affectés). Des pics d'intensité faible ou excessive peuvent être observés, y compris l'amplification excessive des allèles Penta D.

La solution mère de 2800M Control DNA ou la dilution du 2800M Control DNA n'a pas été suffisamment agitée à l'agitateur vortex. Refaire les réactions d'amplification et l'analyse d'électrophorèse capillaire, y compris les contrôles positifs et négatifs.

Le mélange d'amplification PCR n'a pas été suffisamment agité. Refaire les réactions d'amplification et l'analyse d'électrophorèse capillaire, y compris les contrôles positifs et négatifs.

La dilution du 2800M Control DNA a été préparée auparavant et réutilisée. Diluer à nouveau du 2800M Control DNA, puis répéter les réactions d'amplification et l'analyse par électrophorèse capillaire, sans oublier de préparer un nouveau contrôle positif et un nouveau contrôle négatif.

Symptômes

Pics de hauteur faible dans les échantillons normaux ou tumoraux. Les échantillons tumoraux ont peut-être échoué au CQ du signal de l'échantillon tumoral.

Causes et commentaires

Matrice d'ADN en quantité insuffisante. Les faibles hauteurs de pic peuvent interférer avec l'interprétation des données. L'intensité des pics d'allèles des échantillons tumoraux doit être suffisamment élevée pour que les nouveaux allèles dépassant le seuil d'analyse soient détectés (voir la section 6.3.10). Les intensités d'allèles de l'échantillon normal doivent être supérieures ou égales au seuil d'analyse. S'assurer que l'ADN a été correctement quantifié et dilué, puis refaire l'amplification en utilisant 1,0 ng de matrice d'ADN si une erreur de quantification a été constatée. Autrement, procéder à nouveau à l'amplification avec une quantité supérieure d'ADN. Si le problème persiste, refaire le test avec de l'ADN préparé à partir d'une autre section de tissu.

Matrice d'ADN impure. La présence d'impuretés dans les échantillons d'ADN peut nuire à la PCR. Consulter les consignes du fabricant relatives à la méthode d'extraction de l'ADN choisie. Il sera peut-être nécessaire de changer de méthode d'extraction d'ADN si la qualité de l'ADN n'est pas adéquate. L'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System a été effectuée avec de l'ADN provenant d'échantillons de tissu CCR FFPE et extrait avec l'appareil Maxwell® CSC et le kit Maxwell® CSC FFPE DNA. Les autres méthodes ne fourniront peut-être pas la même qualité d'ADN.

Mauvaise injection pendant l'électrophorèse capillaire (les pics de l'étalon de taille Size Standard 500 sont également affectés). Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire des échantillons affectés, y compris des contrôles positifs et négatifs.

Du formamide de mauvaise qualité a été utilisé. Utiliser uniquement du formamide de la série Hi-Di™ 3500 Dx.

Concentration élevée en sels ou pH altéré. Ne pas diluer la matrice d'ADN FFPE dans un tampon à base de Tris-EDTA. Utiliser uniquement de l'eau sans nucléase pour diluer la matrice d'ADN.

Problèmes au niveau du thermocycleur ou de la plaque de réaction (la réaction du contrôle positif a également été affectée). Confirmer que le programme de PCR ne comprend pas d'erreur et que le thermocycleur sélectionné répond aux exigences du OncoMate™ MSI Dx Analysis System (voir la section 3.5). Il sera peut-être nécessaire de calibrer le bloc chauffant. Utiliser uniquement des plaques MicroAmp®.

Les échantillons n'ont pas été correctement dénaturés avant l'électrophorèse capillaire. Dénaturer les échantillons à la chaleur pendant 3 minutes, puis refroidir sur de la glace pilée ou dans un bain d'eau glacée pendant au moins 3 minutes, immédiatement avant l'électrophorèse.

Symptômes

Pics de hauteur faible dans les échantillons normaux ou tumoraux. Les échantillons tumoraux ont peut-être échoué au CQ du signal de l'échantillon tumoral. (suite)

Causes et commentaires

ADN dégradé ou de mauvaise qualité. La fixation inadéquate ou prolongée des échantillons inclus dans la paraffine peut produire de faibles quantités d'ADN ou de l'ADN de mauvaise qualité. Le fait de mal stocker l'ADN après une extraction réussie peut également entraîner sa dégradation. Refaire l'amplification avec une plus grande quantité d'ADN ou préparer à nouveau l'ADN en utilisant une section de tissu différente.

Les composants de la réaction d'amplification ne se sont pas déposés au fond du puits pendant la mise en place de la PCR. Avant le thermocyclage, centrifuger brièvement la plaque dans une centrifugeuse pour microplaques pour attirer le contenu au fond des puits et éliminer les bulles d'air.

Le signal fluorescent des pics d'allèles dépassait la plage dynamique de l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné.

Trop de matrice d'ADN. S'assurer que l'ADN a été adéquatement quantifié et dilué. Si l'on constate une erreur de quantification, refaire l'amplification avec 1,0 ng de matrice d'ADN. Autrement, adopter l'une des approches suivantes : 1) refaire la réaction d'amplification avec une quantité moindre d'ADN, ou 2) diluer les produits d'amplification dans du cocktail de chargement dans un rapport 1/8 (par exemple : 1 µl de produits d'amplification + 7 µl de cocktail de chargement ; voir le tableau 4 pour connaître la composition du cocktail de chargement) et procéder à nouveau à l'analyse d'électrophorèse capillaire avec 1 µl des produits d'amplification dilués. S'assurer que la méthode d'extraction de l'ADN convient aux échantillons de tissu FFPE et que l'ADN a été correctement stocké pour la méthode utilisée.

La matrice d'ADN FFPE a été dégradée ou réticulée. Les matrices d'ADN FFPE dégradées ou réticulées présentent parfois une amplification préférentielle des petits marqueurs, en particulier du NR-21. S'assurer que les échantillons FFPE ont été préparés et conservés dans des conditions adaptées aux extraits d'ADN dérivés de tissu FFPE. On peut adopter l'une des approches suivantes pour traiter les échantillons hors échelle : 1) refaire la réaction d'amplification avec une quantité moindre d'ADN, ou 2) diluer les produits d'amplification dans du cocktail de chargement dans un rapport 1/8 (par exemple : 1 µl de produits d'amplification + 7 µl de cocktail de chargement ; voir le tableau 4 pour connaître la composition du cocktail de chargement) et procéder à nouveau à l'analyse d'électrophorèse capillaire avec 1 µl des produits d'amplification dilués. Si le problème persiste, refaire l'amplification en utilisant une quantité moindre d'ADN. Il sera peut-être nécessaire de re préparer et réanalyser l'ADN avec une section de tissu différente.

Symptômes

Des pics inattendus étaient visibles dans une ou plusieurs couleurs de fluorochrome.

Causes et commentaires

Des pics de « glissement » ont été confondus avec des allèles microsatellites. L'amplification des marqueurs microsatellites produit des artefacts qui apparaissent sous la forme de pics plus petits à 1 bp au-dessus ou en dessous du ou des allèles de répétition de mononucléotides ou à 1 bp ou 5 bp au-dessus ou au-dessous du ou des allèles de répétition de pentanucléotides. Les hauteurs de pic des produits de « glissement » seront plus élevées si l'on a utilisé une trop grande quantité de matrice d'ADN.

Excédent d'ADN. Utiliser 1,0 ng de matrice d'ADN. L'amplification de >4 ng de matrice d'ADN peut produire des artefacts de base élevés dans le marqueur BAT-26 et un nombre plus important de pics de « glissement ».

Interférence ou infiltration. On peut constater une interférence, également appelée infiltration, lorsque les hauteurs de pic sont excessives ou si la qualité de la calibration spectrale n'est pas bonne. Refaire la calibration spectrale de l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné. S'assurer que l'ADN a été adéquatement quantifié et dilué. Refaire l'amplification avec 1,0 ng de matrice d'ADN. Si le problème persiste, refaire l'amplification en utilisant une quantité moindre d'ADN.

Les échantillons n'ont pas été correctement dénaturés avant d'être chargés. Dénaturer les échantillons à la chaleur pendant 3 minutes, puis refroidir sur de la glace pilée ou dans un bain d'eau glacée pendant au moins 3 minutes, immédiatement avant l'électrophorèse capillaire.

Artefacts liés à l'électrophorèse capillaire. On peut observer des pics aberrants pendant l'électrophorèse capillaire. S'assurer que le polymère est porté à température ambiante avant installation et utilisation. Refaire les injections. Si le problème persiste, refaire l'amplification et l'électrophorèse capillaire.

Échantillon de contrôle ou échantillon patient contaminé par une autre matrice d'ADN ou un produit amplifié. La contamination croisée peut poser problème. Utiliser des pointes de pipette anti-aérosols et changer régulièrement de gants.

Un échantillon tumoral instable a été analysé par erreur comme un échantillon de référence normal. Vérifier que les échantillons ont été correctement identifiés et étiquetés. Refaire l'amplification et l'analyse par électrophorèse capillaire des échantillons concernés pour confirmer la source présumée du problème.

Symptômes

Amplification préférentielle des petits marqueurs.

Causes et commentaires

L'ADN a été réticulé. L'ADN préparé à partir d'échantillons fixés au formol et inclus en paraffine est souvent réticulé avec d'autres molécules d'ADN ou de protéines, ce qui empêche l'amplification des fragments d'ADN plus longs. Refaire l'amplification en utilisant une plus grande quantité d'ADN. Si l'on constate une saturation des petits marqueurs avec une plus grande quantité d'ADN, refaire l'extraction de l'ADN et l'analyse de l'échantillon en utilisant une section de tissu différente. Si le problème persiste, cela signifie peut-être que la qualité de l'échantillon de tissu FFPE est trop faible pour que l'analyse réussisse.

ADN dégradé. La matrice d'ADN a été dégradée en fragments plus petits, les grands marqueurs indiquant une réduction de la quantité de produit amplifié généré pendant la PCR. Vérifier que l'ADN de contrôle et les échantillons d'ADN FFPE sont conservés dans des conditions adéquates. Refaire la réaction d'amplification en utilisant une plus grande quantité d'ADN. Si l'on constate une saturation des petits marqueurs avec une plus grande quantité d'ADN, refaire l'extraction de l'ADN et l'analyse de l'échantillon en utilisant une section de tissu différente. Si le problème persiste, cela signifie peut-être que la qualité de l'échantillon de tissu FFPE est trop faible pour que l'analyse réussisse.

Matrice d'ADN en quantité insuffisante. S'assurer que l'ADN est correctement quantifié et dilué, puis refaire l'amplification en utilisant 1,0 ng de matrice d'ADN si une erreur de quantification a été détectée. Si le problème persiste, refaire la réaction d'amplification avec une plus grande quantité d'ADN ou préparer à nouveau l'ADN en utilisant une section de tissu différente.

Un ou plusieurs des allèles pentanucléotidiques présents dans l'échantillon normal étaient absents de l'échantillon tumoral.

Des échantillons d'ADN normal et d'ADN tumoral provenant de différents patients ont été appariés. S'assurer que les échantillons d'ADN normal et d'ADN tumoral ont été correctement appariés sur la plaque de PCR et pendant l'analyse d'électrophorèse capillaire. S'assurer que les échantillons ont correctement été étiquetés. Refaire l'analyse d'électrophorèse capillaire des échantillons affectés en s'assurant qu'ils sont correctement appariés, sans oublier les réactions des contrôles positifs et négatifs. Si le problème persiste, refaire les réactions d'amplification.

L'échantillon tumoral présente une perte d'hétérozygotie. Voir la section 6.5.3 et le schéma 13 pour plus d'informations sur comment interpréter les données de ces échantillons tumoraux.

10. Bibliographie

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. Informations supplémentaires

Coordonnées sur : www.promega.com ; adresse électronique : genetic@promega.com

11.1 Annexe A

Les paramètres de calibration spectrale utilisés pour l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System avec l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx figurent ci-dessous.

Voici les paramètres à utiliser pour effectuer la calibration spectrale avec un analyseur génétique de la série Applied Biosystems® 3500 :

Jeu de fluorochromes : AnyDye (série 3500)

Ordre des fluorochromes : 5, bleu ; 4, vert ; 3, jaune ; 2, rouge ; 1, orange (le violet est désélectionné)

Limite supérieure de la valeur de chevauchement de la matrice : 8,0

Localiser le point de départ après analyse : 300

Localiser le point de départ avant analyse : 5000

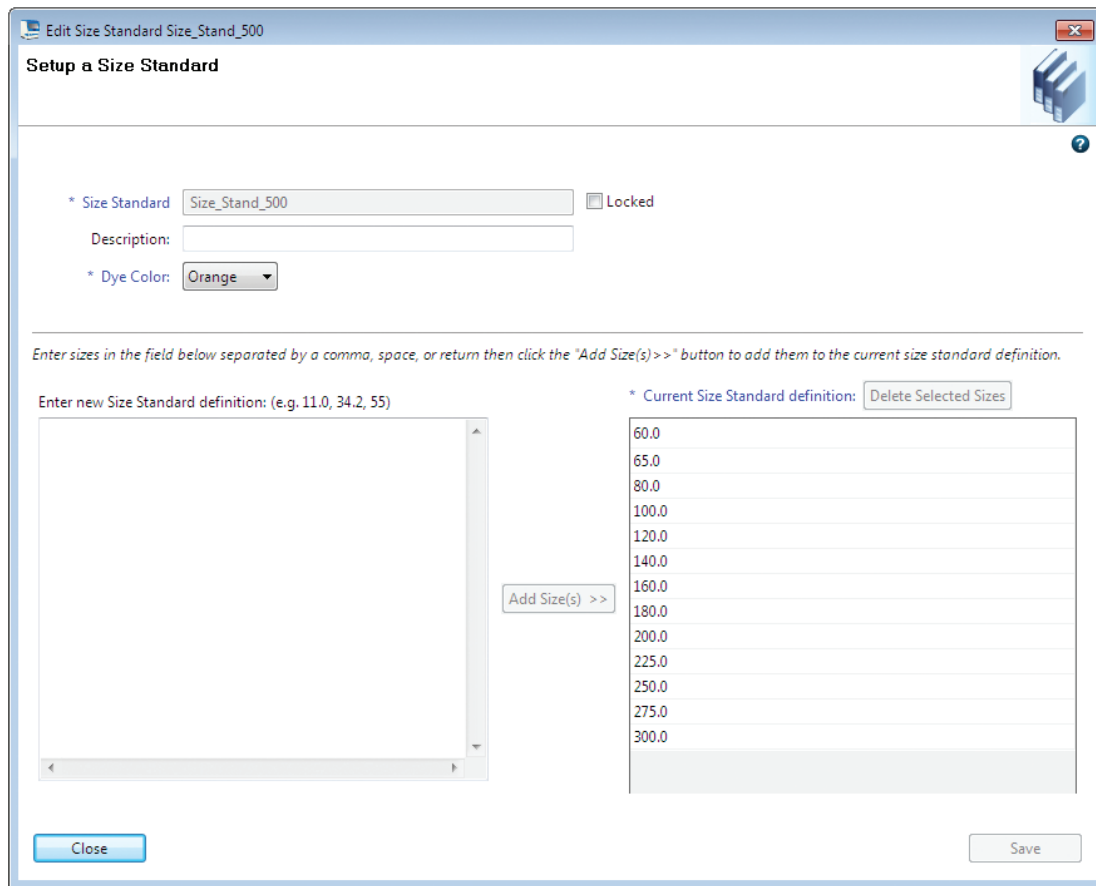
Limiter les analyses à : 6500

Sensibilité : 0,4

Score de qualité minimal : 0,95

11.2 Annexe B

Les paramètres d'analyse de fragments utilisés pour évaluer la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System avec l'analyseur génétique Applied Biosystems® 3500 Dx figurent ci-dessous.



Edit Size Standard Size_Stand_500

Setup a Size Standard

* Size Standard: ☐ Locked

Description:

* Dye Color:

Enter sizes in the field below separated by a comma, space, or return then click the "Add Size(s) >>" button to add them to the current size standard definition.

Enter new Size Standard definition: (e.g. 11.0, 34.2, 55)

* Current Size Standard definition:

60.0
65.0
80.0
100.0
120.0
140.0
160.0
180.0
200.0
225.0
250.0
275.0
300.0

16190TA

Schéma 14. Définition de « l'étalon de taille » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

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:

Schéma 15. Paramètres du « protocole de l'appareil » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

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

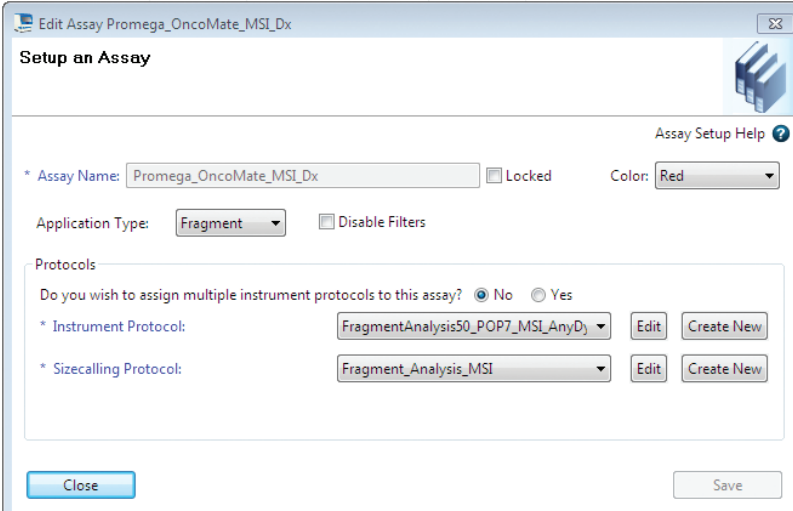
Polynomial Degree

Slope Threshold Peak Start

Slope Threshold Peak End

16192TA

Schéma 16. Paramètres du « protocole de détermination des tailles » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.



Edit Assay Promega_OncoMate_MSI_Dx

Setup an Assay

Assay Setup Help ?

* Assay Name: Promega_OncoMate_MSI_Dx ☐ Locked Color: Red

Application Type: Fragment ☐ Disable Filters

Protocols

Do you wish to assign multiple instrument protocols to this assay? ☒ No ☐ Yes

* Instrument Protocol: FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDj Edit Create New

* Sizcalling Protocol: Fragment_Analysis_MSI Edit Create New

Close Save

16193TA

Schéma 17. Paramètres de « test » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

11.3 Annexe C

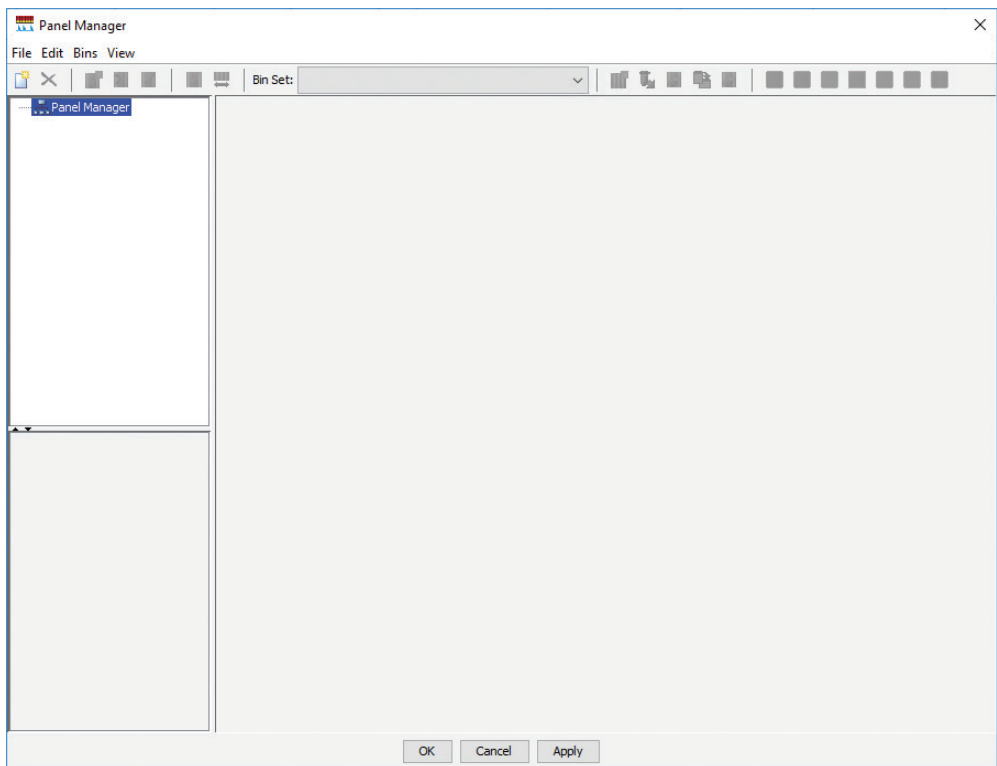
Paramètres d'analyse des données du GeneMapper® 5.0 utilisés pendant l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Remarque : Les fichiers de réglages et les consignes concernant l'analyse des données du GeneMapper® sont fournis par souci de commodité et s'appliquent spécifiquement aux données d'électrophorèse capillaire générées en utilisant un réseau de 50 cm et un polymère POP-7®. Les utilisateurs qui analysent les produits amplifiés du OncoMate™ MSI Dx Analysis System en utilisant une configuration différente de l'appareil d'électrophorèse capillaire doivent vérifier que les consignes d'analyse des données conviennent à la configuration qu'ils ont choisie. Les méthodes d'analyse créées par l'utilisateur sont parfois mieux adaptées à une configuration spécifique.

Importation des fichiers de réglages de GeneMapper

Pour faciliter l'analyse des données générées avec le OncoMate™ MSI Dx Analysis System, nous avons créé des fichiers (panels, méthode d'analyse, étalon de taille, réglages des tracés, réglages des tableaux et réglages des rapports) à importer dans le logiciel GeneMapper®, version 5.0 ou 6.0. Ils sont téléchargeables sur le site Internet de Promega : www.promega.com/OncomatePanels. Les définitions de panels, étalon de taille et méthode d'analyse sont également fournies ci-dessous (tableaux 9 et 10, schéma 19). Pour plus d'informations, se reporter à la documentation des versions 5.0 et 6.0 du logiciel GeneMapper®.

1. Ouvrir le logiciel GeneMapper®, version 5.0 ou 6.0.
2. Sélectionner **Outils [Tools]**, puis **Gestionnaire des panels [Panel Manager]**.
3. Sélectionner **Gestionnaire des panels [Panel Manager]** dans le volet supérieur gauche (schéma 18).
4. Dans le menu, sélectionner **Fichier [File]**, puis **Importer les panels [Import Panels]**. L'icône du gestionnaire des panels doit être sélectionnée (surlignée en bleu) pour que l'option **Importer les panels [Import Panels]** soit sélectionnable.
5. Se rendre à l'emplacement où le fichier texte des panels a été enregistré sur l'ordinateur. Sélectionner le fichier **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0**, puis **Importer [Import]**.
6. En bas de la fenêtre du gestionnaire des panels, sélectionner **Appliquer [Apply]**, puis **OK**.
7. Sélectionner **Outils [Tools]**, puis **[Gestionnaire de GeneMapper [GeneMapper Manager]]**.
8. Sélectionner l'onglet « Étalons de taille [Size Standards] », puis sélectionner **Importer [Import]** en bas de la fenêtre du gestionnaire de GeneMapper.
9. Se rendre à l'emplacement où le fichier des étalons de taille (Size Standards) de taille a été enregistré sur l'ordinateur. Sélectionner le fichier **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0**, puis **Importer [Import]**.
10. Laisser le gestionnaire de GeneMapper Manager ouvert et répéter la procédure décrite aux étapes 8 et 9 pour importer les fichiers de réglages restants (méthode d'analyse, réglages des tracés, réglages des tableaux et réglages des rapports).
11. Lorsque tous les fichiers de réglages ont été importés, cliquer sur **Terminé [Done]** en bas de la fenêtre du gestionnaire de GeneMapper.



16194TA

Schéma 18. La fenêtre du gestionnaire de panels GeneMapper® avec l'icône Gestionnaire des panels sélectionnée.

L'option « Importer les panels [Import Panels] » (étape 4) est accessible depuis le menu « Fichier [File] » lorsque l'icône du gestionnaire des panels est sélectionnée (surlignée en bleu).

Tableau 9. Définition des panels de marqueur.

Marqueur	Canal de fluorochrome	Plage du panel (en bp) ¹		Type de répétition ²
		Début	Fin	
BAT-26	Bleu	83	121	1
Penta D	Bleu	123	253	5
NR-21	Vert	83	108	1
BAT-25	Vert	110	132	1
MONO-27	Vert	134	168	1
NR-24	Jaune	103	138	1
Penta C	Jaune	140	228	5

¹La gamme de taille prévue pour les amplicons de chaque marqueur doit être définie dans le logiciel d'analyse de fragments sélectionné.

²Le type de microsatellites est défini dans ce tableau par le chiffre 1 (pour les marqueurs de répétition de mononucléotides) et le chiffre 5 (pour les marqueurs de répétition de pentanucléotides).

Tableau 10. Définition de l'étalon de taille. L'étalon de taille Size Standard 500 contient des pics de fragment allant de 60 à 500 pb, bien que l'analyse des pics de fragments mesurant entre 60 et 300 pb soit suffisante pour déterminer la taille des fragments du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

No. de fragment de l'étalon de taille	Taille de fragment (en 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

Start Pt: 300
Stop Pt: 10000

Sizing

All Sizes

Start Size: 50
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
G: 175
Y: 175

R: 175
P: 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: 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:

Sizing Quality: From 0.75 to 1.0
Genotype Quality: From 0.75 to 1.0

Low Quality Range:

Sizing Quality: From 0.0 to 0.25
Genotype Quality: From 0.0 to 0.25

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

Factory Defaults

OK

Cancel

Schéma 19. Paramètres d'analyse utilisés pour l'évaluation de la performance du OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

64 Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 (États-Unis) · Numéro vert aux É-U : 800-356-9526 · (+1) 608-274-4330 · Fax (+1) 608-277-2516
TM595 · Rév 0 www.promega.com

16195TA

^(a)U.S. Pat. No. 9,139,868, European Pat. No. 2972229 and other patents pending.

^(b)TMR-ET, CXR-ET and WEN are proprietary.

© 2019, Promega Corporation. Tous droits réservés.

GoTaq et Maxwell sont des marques déposées de Promega Corporation. OncoMate est une marque de commerce de Promega Corporation.

Applied Biosystems, GeneMapper et Veriti sont des marques déposées de Applied Biosystems MasterCycler est une marque déposée de Eppendorf. Hi-Di est une marque de commerce de Applera Corporation. C1000 Touch est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. MicroAmp et POP-7 sont des marques déposées de Thermo Fisher Scientific.

Les produits peuvent être protégés par des brevets en instance ou déposés, ou peuvent présenter certaines restrictions. Rendez-vous sur notre site Internet pour un complément d'informations. Tous les prix et toutes les caractéristiques sont sujets à modification sans avis préalable.

Les déclarations relatives aux produits sont sujettes à modification. Veuillez contacter le service technique de Promega ou consulter le catalogue en ligne de Promega pour obtenir les informations les plus récentes sur les produits Promega.