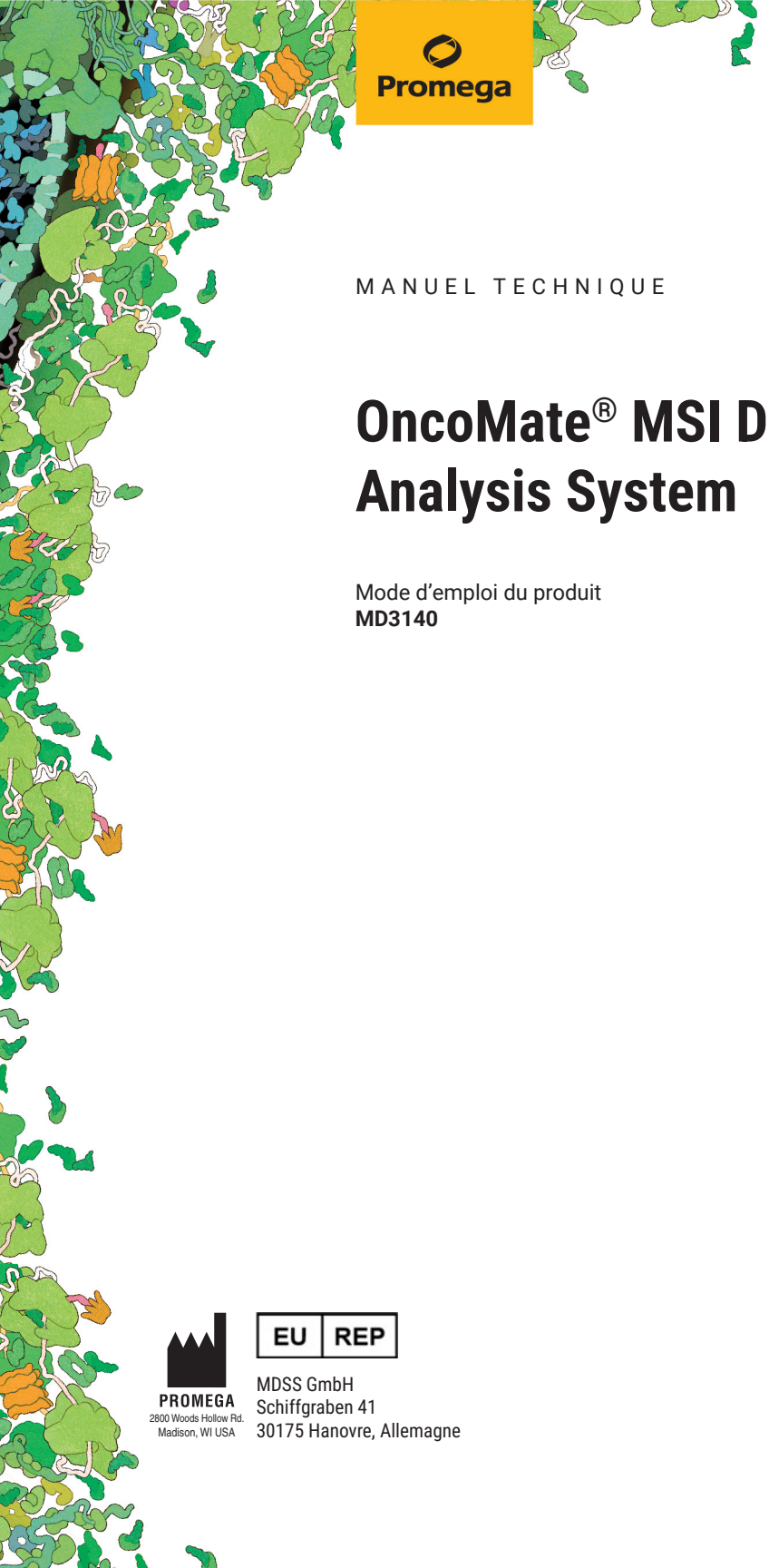


MANUEL TECHNIQUE

OncoMate® MSI Dx Analysis System

Mode d'emploi du produit
MD3140

PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA

EU REP
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

CE 2797

MODE D'EMPLOI
DU PRODUIT
MD3140

IVD

Rev2
TM595

Promega

OncoMate® MSI Dx Analysis System

1. Introduction 3
   - 1.1 Présentation de l'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 Usage prévu 7
   - 1.6 Informations contextuelles 8
   - 1.7 Principe de test 9

2. Composants du produit et conditions de stockage 12
   - 2.1 Matériel fourni avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System (Cat.# MD3140) 12
   - 2.2 Stockage et manutention de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System 13
   - 2.3 Matériel non fourni 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 d'essai 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 de l'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 de l'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 24
   - 5.1 Introduction 24
   - 5.2 Analyser les données 25

Promega

6. Examen et interprétation des résultats 27
- **6.1 Comprendre les données de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System 28**
- **6.2 Résumé des artefacts d'amplification connus et des anomalies d'électrophorèse capillaire 30**
- **6.3 Exigences en matière de contrôle de la qualité pour l'interprétation des données 31**
- **6.4 Détermination de la stabilité des marqueurs de répétition de mononucléotides 42**
- **6.5 Interprétation du statut MSI d'une tumeur 44**

7. Contrôles qualité de l'essai 49
- **7.1 Calibration spectrale 49**
- **7.2 Échantillon de tissu normal apparié 49**
- **7.3 Témoins positifs et négatifs 49**
- **7.4 Étalons d'électrophorèse capillaire 50**
- **7.5 Seuil d'analyse 50**

8. Limites spécifiques 51

9. Dépannage 52

10. Bibliographie 60

11. Informations supplémentaires 61
- **11.1 Annexe A 61**
- **11.2 Annexe B 62**
- **11.3 Annexe C 66**

12. Performances analytiques 70
- **12.1 Extraction de l'ADN 70**
- **12.2 Plage normale et limite 70**
- **12.3 Limite du blanc 72**
- **12.4 Limite de détection 72**
- **12.5 Spécificité analytique 77**
- **12.6 Substances interférentes 77**
- **12.7 Contamination croisée 79**
- **12.8 Reproductibilité 79**
- **12.9 Évaluation de la concordance entre les méthodes d'analyse des données 82**

13. Performances cliniques 83
- **13.1 Résultats de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System vs. IHC 83**

14. Récapitulatif des modifications 84

Date de révision TM595 : 7/26

Version : Rev2

1. Introduction

1.1 Présentation de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System

Ce manuel décrit l'OncoMate® MSI Dx Analysis System[a–c] et est la principale source d'informations sur son usage prévu, ses composants, ses limites, son protocole, le dépannage, etc. L'OncoMate® MSI Dx Analysis System est un dispositif médical de diagnostic in vitro (IVD) bénéficiant du marquage CE, qui utilise l'analyse basée sur la PCR par fluorescence dans le cadre d'un travail de laboratoire plus large (Figure 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 l'OncoMate® 5C Matrix Standard (Cat.# MD3850) pour l'analyse par électrophorèse capillaire des produits amplifiés de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Les consignes d'utilisation de l'OncoMate® 5C Matrix Standard sont fournies dans le *Manuel technique de l'OncoMate® 5C Matrix Standard* #TM597.

L'intégralité du processus relatif à l'utilisation de l'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 de l'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 de quantification d'ADN fluorescents, instruments ou les deux (voir la Section 1.7)

Amplifier l'ADN.
OncoMate™ MSI Dx Analysis System (Cat.# MD3140, TM595)
Thermocycleur capable d'augmenter de 3,9 à 5 °C/seconde

Calibrer le spectre des fluorochromes.
OncoMate™ 5C Matrix Standards (Cat.# MD3850, TM597)

Séparer et détecter.
Applied Biosystem® 3500 Dx Genetic Analyzer
ou appareil d'électrophorèse capillaire comparable

Analyser et interpréter les données.
Logiciel d'analyse des fragments

1520.7TB

Figure 1. Processus de laboratoire associé à l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

1.2 Nom du produit

OncoMate® MSI Dx Analysis System
Cat.# MD3140, 100 reactions Σ 100

1.3 Abréviations et définitions

bp, paire de bases

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

QC, quality control (contrôle qualité)

NA, not applicable (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

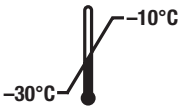
Quasi-monomorphique : marqueur d'ADN pour lequel la plupart des patients sont homozygotes pour le même allèle commun

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		Numéro de lot
	Ne pas réutiliser		Contenu suffisant pour <n> tests
	Date limite d'utilisation		Protéger de la lumière
	Consulter le mode d'emploi		

1.5 Usage prévu

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System est un test qualitatif non automatisé pour la mesure 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 de patients chez lesquels un cancer colorectal a déjà été diagnostiqué. L'OncoMate® MSI Dx Analysis System facilite le diagnostic des patients porteurs du syndrome de Lynch, un syndrome de cancer héréditaire, en identifiant les patients atteints par un cancer colorectal avec des tumeurs MSI-High susceptibles de bénéficier de tests de la lignée germinale supplémentaires. L'OncoMate® MSI Dx Analysis System n'est pas destiné à être utilisé comme aide à la sélection des médicaments pour des patients atteints de cancer.

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System génère des profils alléliques à partir d'échantillons de tissus FFPE tumoraux et normaux prélevés sur un même patient, par le biais de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) de 5 marqueurs microsatellites mononucléotidiques de l'ADN (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et MONO-27), puis de la séparation par électrophorèse capillaire des marqueurs amplifiés à l'aide de la détection par fluorescence sur un appareil d'électrophorèse capillaire. On détermine le statut MSI en comparant les profils alléliques. Une altération 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 en vue de leur comparaison afin que les résultats soient valables.

Les résultats des tests obtenus à l'aide de ce produit doivent être interprétés par un professionnel de santé, en tenant compte des autres résultats cliniques, des antécédents familiaux et des données de laboratoire. Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement.

Promega

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 par rapport aux échantillons de tissus normaux (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. Les tests de l'instabilité des microsatellites ne peuvent pas être utilisés pour diagnostiquer le syndrome de Lynch. Par contre, les tests MSI constituent une méthode rapide et économique pour identifier une déficience du système MMR dans les cellules tumorales CCR. 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 couramment associés au syndrome de Lynch sont, entre autres, les cancers colorectaux. 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 aux tests MMR ou MSI universels chez tous les patients qui présentent des antécédents personnels de cancer du côlon ou du rectum 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) et la Société américaine d'oncologie clinique (Sepulveda, 2017 ; Stoffel, 2015).

1.7 Principe de test

L'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. L'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, Figure 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 bases, bp) de l'échantillon tumoral avec l'échantillon normal pour déterminer la présence d'un nouvel allèle représentatif d'une MSI (Figure 3).
On interprète un marqueur comme étant instable lorsque l'on détecte un nouvel allèle dont la taille diffère d'au moins 2,75 bp (3 bases moins 0,25 paire de bases 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 quasimonomorphiques (c.-à-d. que la plupart des individus sont homozygotes pour les mêmes allèles communs) et que 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 l'OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit. Les plages correspondent aux tailles attendues pour des données générées à l'aide de POP-7® Polymer 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 à 121 bp
NR-21	$A_{(21)}$	Vert	83 à 108 bp
BAT-25	$A_{(25)}$	Vert	110 à 132 bp
MONO-27	$A_{(27)}$	Vert	134 à 168 bp
NR-24	$A_{(24)}$	Jaune (affiché en noir)	103 à 138 bp
Marqueurs pentanucléotides	**Structure de répétition**	**Canal de détection**	**Plage de tailles amplifiées**
Penta D	$AAAGA_{(2–17)}$	Bleu	123 à 253 bp
Penta C	$AAAAC_{(4–17)}$	Jaune (affiché en noir)	140 à 228 bp

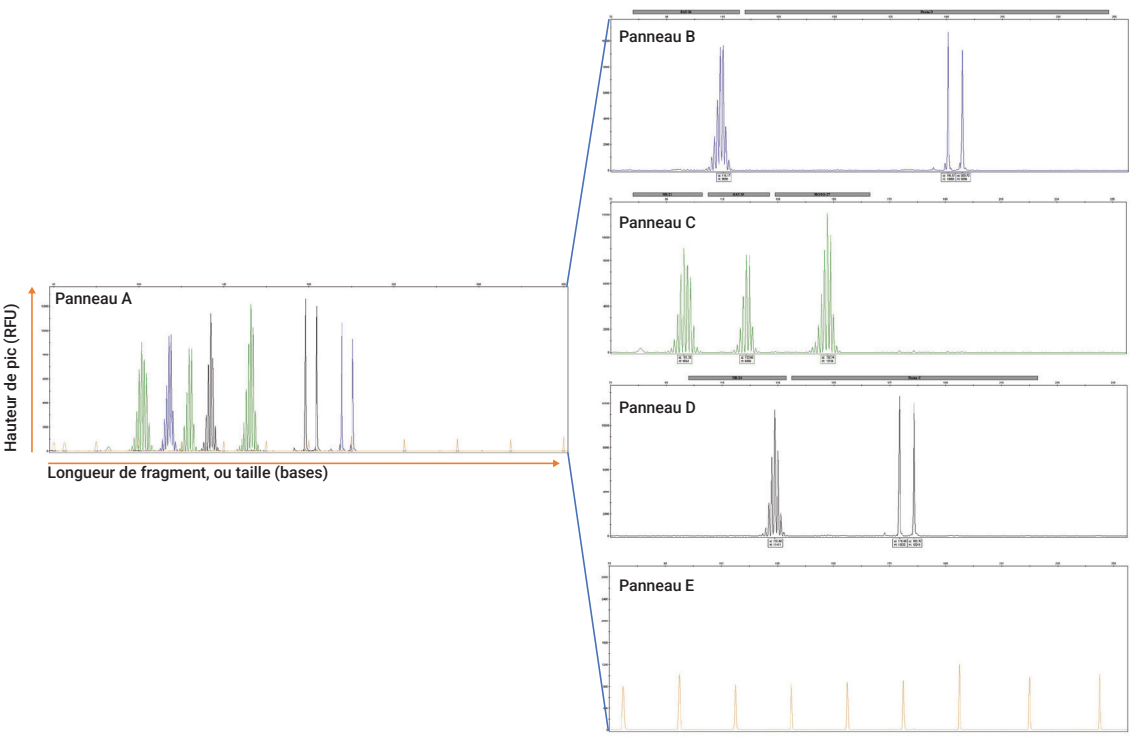


Figure 2. Exemple de données de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Une matrice unique d'ADN génomique (1 ng) a été amplifiée avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et les produits de PCR ont été analysés à l'aide de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec du POP-7® Polymer et un réseau capillaire de 50 cm.
Panneau A. Électrophorégramme montrant la détection simultanée de tous les fragments d'ADN marqués par fluorescence.
Panneaux B à E. Données microsatellites affichées par canal de détection pour faciliter l'interprétation.
Le panneau E illustre les pics de fragment du Size Standard 500.

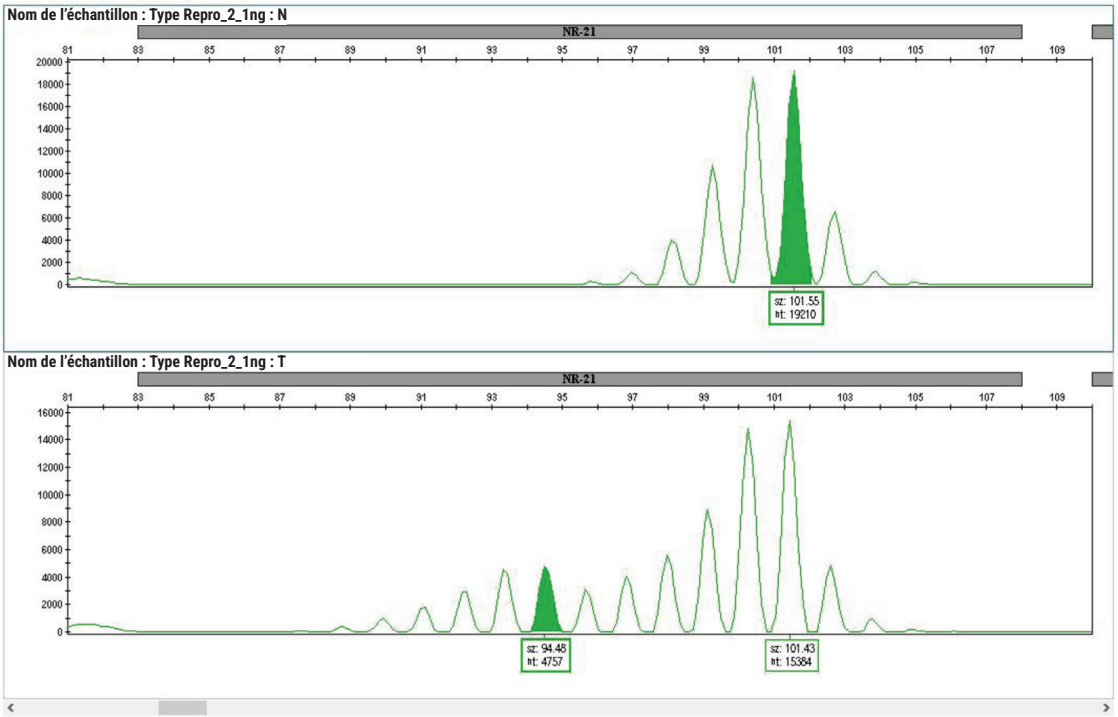


Figure 3. Évaluation de la stabilité des marqueurs mononucléides. Dans l'exemple ci-dessus, les allèles microsatellites d'intérêt sont mis en évidence. Pour un marqueur mononucléotidique, si la taille du nouvel allèle de l'échantillon tumoral varie de celle de l'allèle de référence de l'échantillon normal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

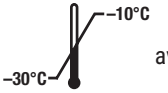
2.1 Matériel fourni avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System (Cat.# MD3140)

Σ 100 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**

Inclut : 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.

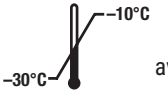
Conditions de stockage : zone de préamplification ; 

avant utilisation ; 

après la première utilisation. Protéger de la lumière.

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

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

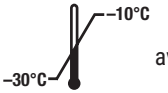
Conditions de stockage : zone de préamplification ; 

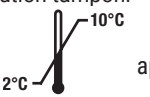
avant utilisation ; 

après la première utilisation.

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

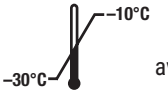
Inclut : standard d'ADN génomique humain dérivée de la lignée cellulaire dans une solution tampon.

Conditions de stockage : zone de préamplification ; 

avant utilisation ; 

après la première utilisation.

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

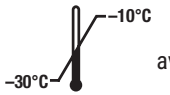
Conditions de stockage : zone de préamplification ; 

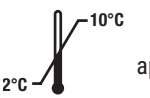
avant utilisation ; 

après la première utilisation.

COMPOSANT	TAILLE	RÉF.
Size Standard 500	**100 µl**	**MD500A**

Inclut : fragments d'ADN marqués avec des fluorochromes dans une solution tampon.

Conditions de stockage : zone de postamplification ; 

avant utilisation ; 

après la première utilisation. Protéger de la lumière.

2.2 Stockage et manutention de l'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 fonction antigivre. 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 l'OncoMate® MSI Dx Analysis System entre 2 °C et 10 °C jusqu'à 3 mois. L'OncoMate® MSI 5X Primer Mix et le Size Standard 500 sont photosensibles et doivent être conservés à l'abri de la lumière. Ne pas recongeler. Stocker les réactifs de préamplification et de postamplification dans des pièces séparées et les utiliser avec des pipettes, des supports à tubes (etc.) qui leur sont réservés. Les composants stockés dans d'autres conditions que celles indiquées sur les étiquettes pourraient ne pas fonctionner correctement et nuire aux résultats.

2.3 Matériel non fourni

Réactifs de laboratoire

- Système d'extraction de l'ADN (voir les Sections 3.3 et 3.4)
- OncoMate® 5C Matrix Standard (Promega Cat.# MD3850)
- Hi-Di™ Formamide (par ex. Applied Biosystems Cat.# 4404307)
- Réactifs pour quantification de l'ADNds avec fluorochromes (voir la Section 3.4)
- Nuclease-Free Water (Promega Cat.# MC1191)

Remarque : il est essentiel d'utiliser du Hi-Di™ Formamide de qualité supérieure. Congeler le Hi-Di™ Formamide 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 préamplification et l'autre pour les procédures de postamplification.

- Jeu de pipettes de précision étalonnées, d'une capacité de 1 µl à 1 000 µl
- Cônes de pipettes résistants à l'aérosol (de 10 µl à 1 000 µl)
- Tube microcentrifuge de 1,5 ml
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate avec code-barres (Thermo Fisher Scientific Cat.# 4306737)
- MicroAmp® 8-Cap Strip, clear (Thermo Fisher Scientific Cat.# N8010535) (préamplification uniquement)
- Micro-centrifugeuse personnelle (« mini-centrifugeuse »)
- Centrifugeuse compatible avec plaque de réaction à 96 puits (par ex., centrifugeuse pour microplaques)
- Supports pour microtubes à centrifuger
- Agitateur vortex
- Congélateur sans fonction antigivre entre –30 °C et –10 °C
- Réfrigérateur entre 2 °C et 10 °C
- Glace pilée (postamplification uniquement)
- Matériel d'extraction de l'ADN (blocs chauffants, centrifugeuses, etc.), en fonction de la méthode sélectionnée (préamplification uniquement)

Instruments 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 relatif à la sécurité chimique : certains des réactifs utilisés pour l'analyse des fragments sont potentiellement dangereux. Manipuler et mettre au rebut les matériaux dangereux conformément aux directives définies par votre établissement. Le formamide est un irritant et un tératogène (voir Section 2.3, Matériel non fourni). 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 de la fiche de données de sécurité : la fiche de données de sécurité (SDS) contient des informations importantes concernant la manipulation, le transport et la mise au rebut en toute sécurité de ce produit. Les SDS pour tous les réactifs fournis dans les kits sont disponibles en ligne à l'adresse : **www.promega.com/resources/msds/** ou sur demande en contactant Promega Technical Services : **genetic@promega.com**

Précautions relatives à la sécurité biologique : l'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, l'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 l'analyse des produits de l'amplification. Stocker et utiliser les réactifs et éléments utilisés avant l'amplification (OncoMate® MSI 5X Master Mix, OncoMate® MSI 5X Primer Mix, 2800M Control DNA et Water, Amplification Grade) dans une autre pièce que celle où sont stockés les produits de post-amplification (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 avec témoin négatif (c.-à-d. sans matrice) pour détecter toute contamination des réactifs et une réaction avec témoin positif pour contrôler les performances des réactifs. Porter des gants et utiliser des pointes de pipette anti-aérosols afin d'éviter toute contamination croisée.

3.2 Exigences relatives aux échantillons

Les sections de tissu appropriées pour l'essai 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 des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été réalisée en utilisant de l'ADN extrait avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC DNA FFPE Kit 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 la qualité de l'ADN

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 cet essai. On peut utiliser des témoins de la PCR pour détecter la présence d'inhibiteurs d'amplification dans les extraits d'ADN purifiés.

Les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été évaluées avec un ADN provenant d'échantillons de tissus FFPE de cancer colorectal extraits avec le Maxwell® CSC DNA FFPE Kit (Cat.# AS1350) conjointement avec le Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000). L'ADN purifié à l'aide du Maxwell® CSC DNA FFPE Kit et du Maxwell® CSC ou CSC 48 Instrument est stable jusqu'à 14 jours lorsqu'il est conservé à 4 °C ou jusqu'à un mois lorsqu'il est conservé à –20°C avant les tests. Si une autre méthode d'extraction de l'ADN est utilisée, l'utilisateur devrait consulter les informations relatives à la stabilité de l'ADN dans le mode d'emploi du système d'extraction d'ADN utilisé. 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 µM dans l'ADN extrait n'interfère pas avec les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

3.4 Exigences relatives à la quantité d'ADN

Le kit d'amplification de l'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.).

L'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/µl. Pendant l'évaluation des performances, l'ADN a été quantifié à l'aide du QuantiFluor® dsDNA System (Cat.# E2670), conçu pour une utilisation générale en laboratoire.

3.5 Exigences relatives au thermocycleur

Les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été évaluées à l'aide des thermocycleurs Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® et Bio-Rad C1000 Touch™, qui présentent les spécifications minimales suivantes :

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

Précision de la température : ±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

L'utilisation des thermocycleurs dont les spécifications sortent des plages indiquées peut nuire aux performances de cet essai.

3.6 Exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire

Les produits d'amplification de l'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 utilisé la méthode d'analyse des fragments par défaut fournie par le logiciel de collecte de données et diverses 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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été évaluées à l'aide de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer configuré avec du POP-7® Polymer et un réseau capillaire de 50 cm. Les conditions de fonctionnement utilisées pendant l'évaluation des performances figurent dans l'Annexe B (Section 11.2). Les appareils d'électrophorèse capillaire compatibles avec l'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 mesures (répétabilité, exprimée en écart-type) : ≤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 de l'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 l'OncoMate® 5C Matrix Standard (Cat.# MD3850). La calibration spectrale s'effectue en suivant les consignes du *Manuel technique de l'OncoMate® 5C Matrix Standard* #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) de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Les réglages de calibration utilisés pendant l'évaluation des performances 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 de l'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 Local Southern, 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 (par ex. pics hors échelle) capturées pendant l'électrophorèse capillaire et calculera les paramètres QC de base (par ex. identification des pics larges) en fonction des réglages définis par l'utilisateur.

Les données générées pendant l'évaluation des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été analysées à l'aide du GeneMapper® Software (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) de l'essai 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. Il est essentiel de fixer un seuil d'analyse pour garantir la qualité des données du patient (voir la Section 7.5). On trouvera dans la littérature technique des procédures adaptées pour déterminer le seuil d'analyse (par ex. Bregu, 2013). Pendant l'évaluation des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System avec l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer, 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 différentes teneurs en ADN (Bregu, 2013).

Promega

4. Protocole d'essai

Stocker les réactifs de préamplification et de postamplification 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 afin d'éviter 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 témoins négatifs) aux réactions d'amplification.

4.1 Dilution des extraits FFPE d'ADN tissulaire

L'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 des performances de l'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 de mauvaises performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

2. Diluer l'échantillon d'ADN dans de la Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) à 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 : utiliser de la Nuclease-Free Water s'il est nécessaire de diluer l'échantillon. 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 de mauvaises performances de l'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 l'essai.

4.2 Dilution du 2800M Control DNA

Le 2800M Control DNA sert de témoin positif de l'amplification (Section 7.3), et non pas de témoin MSI. L'OncoMate® MSI Dx Analysis System est conçu pour être utilisé avec 1,0 ng de 2800M Control DNA fourni dans un volume de 1,0 µl à 6,0 µl. Avant l'utilisation, stocker le 2800M Control DNA (10 ng/µl) entre 2 °C et 10 °C pendant au moins 8 heures.
Nous recommandons de diluer l'ADN témoin à la même concentration que les échantillons de test. Pendant l'évaluation des performances de l'OncoMate® MSI Dx System, le 2800M Control DNA a été dilué à 0,5 ng/µl et un volume de 2µl de d'ADN témoin 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 la Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) ou dans de la Water, Amplification Grade, de manière à ajouter 1,0 ng à la réaction avec témoin positif dans le volume souhaité (1 à 6 µl). Voir des exemples de dilution dans le Tableau 2. Pour plus de précision, pipeter des volumes ≥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 de 2800M Control DNA (10 ng/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

[1]Nuclease-Free Water ou Water, Amplification Grade

Remarque : préparer une nouvelle dilution de 2800M Control DNA pour chaque expérience. Du 2800M Control DNA dilué qui a été conservé pour une utilisation ultérieure peut donner lieu à une mauvaise amplification et faire échouer l'essai.

4.3 Préparation des réactions d'amplification de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System

1. Lors de la première utilisation, décongeler complètement l'OncoMate MSI 5X Primer Mix, l'OncoMate MSI 5X Master Mix 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 à 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 MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate.
4. Déterminer le nombre de réactions à préparer. Il faut compter au moins une réaction avec témoin d'amplification positif et une réaction avec témoin 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 indiqué dans le Tableau 3. Ajouter le volume final de Water, Amplification Grade, d'OncoMate® 5X Master Mix et d'OncoMate® 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	×		=	
OncoMate® MSI 5X Master Mix[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				

   [1]Ajouter la Water, Amplification Grade, l'OncoMate® 5X Master Mix et l'OncoMate® 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.

   [2]Un précipité peut se former dans l'OncoMate® MSI 5X Master Mix. La présence du précipité ne nuira pas à l'amplification de l'ADN effectuée avec l'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 PCR dans chaque puits de la/des plaque(s) de réaction utilisée(s) pour les échantillons et les témoins.

   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 à 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 à 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 pipetant 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 à 2 secondes) dans une mini-centrifugeuse pour attirer le liquide au fond du tube. Pipeter 1,0 ng de 2800M Control DNA dilué dans le(s) puits réservé(s) à la/aux réaction(s) avec témoin positif. Mélanger en pipetant plusieurs fois.
9. Pour le témoin 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) avec témoin négatif. Ne pas ajouter la matrice d'ADN aux réactions avec témoin négatif. Mélanger en pipetant plusieurs fois.

   Remarque : le fait de ne pas amplifier et analyser les réactions avec témoins négatif et positif peut favoriser l'incertitude pendant l'analyse des données des résultats et compliquer le dépannage. Il faut inclure des réactions avec témoins positif et négatif sur chaque plaque.
10. Fermer les puits avec les MicroAmp® 8-Cap Strips 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 à 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 à la Figure 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 thermocyclage[1]
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

[1]Volume de réaction : 10 µl ; couvercle chauffant : 103 °C à 105 °C

Figure 4. Protocole de thermocyclage pour l'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 °C 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 les exigences relatives à l'appareil d'électrophorèse capillaire à la Section 3.6. 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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System pour l'électrophorèse capillaire

1. Si les échantillons amplifiés ont été stockés entre –30 °C 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 avec témoins 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 le 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 lors de la manipulation de 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
Hi-Di™ Formamide	9,5 µl	×		=	
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 d'une MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate avec l'appareil d'électrophorèse capillaire sélectionné.

   Remarque : ajouter du cocktail de chargement ou du Hi-Di™ Formamide 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 de cocktail de chargement ou de Hi-Di™ Formamide dans un puits qui fait l'objet d'une injection peut endommager le réseau capillaire et provoquer l'échec de l'essai.

6. Ajouter 1 µl de l'échantillon amplifié ou de la réaction de contrôle dans 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 de Promega, ou envoyer un courriel à : **genetic@promega.com** pour plus d'informations.

Promega

5. Analyse des données

5.1 Introduction

L'électrophorèse capillaire des produits d'amplification de l'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 (Figure 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 les consignes à l'Annexe C (Section 11.3) :

- 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.

Le GeneMapper® Software a été utilisé pour évaluer les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.
Les paramètres d'analyse finale des données utilisés pendant l'évaluation des performances de l'essai 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 illustré à la Figure 5 et décrit ci-dessous à la Section 5.2 en prenant l'exemple du GeneMapper® Software.
Vous trouverez des consignes supplémentaires sur l'analyse des données de fragments avec le GeneMapper® Software dans le *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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été déterminés à l'aide de données générées avec un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec le POP-7® Polymer 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 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 (Peak Amplitude Thresholds [Seuils d'amplitude des pics] sous l'onglet Peak Detector [Détecteur de pics] du GeneMapper® Analysis Method Editor [Éditeur de méthode d'analyse de 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 des performances de l'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 compris entre 50 RFU et 200 RFU. Vous trouverez une présentation de l'utilisation correcte et des effets des différents réglages d'analyse dans le *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.



Figure 5. Processus d'analyse des données d'électrophorèse capillaire de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

5.2 Analyser les données

Les consignes indiquant comment analyser les données à l'aide de GeneMapper® Software 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 GeneMapper® Software, version 5.0 ou 6.0.
2. Sélectionner l'icône New Project (Nouveau projet,) dans la barre d'outils et choisir le type de projet **Microsatellite**.
3. Pour importer les données, sélectionner l'icône Add Samples To Project (Ajouter des échantillons au projet,) dans la barre d'outils.
4. Dans le menu déroulant Table Setting (Réglage du tableau) de la barre d'outils, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0**.
5. Si le champ Sample Type (Type d'échantillon) n'est pas renseigné, choisir **Sample (Échantillon)**, **Positive Control (Témoin positif)** ou **Negative Control (Témoin négatif)** pour décrire chaque échantillon.
6. Pour tous les échantillons de contrôles et échantillons patient, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0** pour Analysis Method (Méthode d'analyse), **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** pour Panel et **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** pour Size Standard (Étalon de taille).

7. Sélectionner l'icône Analyze (Analyser) ( ) dans la barre d'outils pour analyser tous les échantillons. Dans la fenêtre contextuelle Save Project (Enregistrer le projet), saisir un nom de projet descriptif, puis cliquer sur **OK**.

   Remarque : après l'analyse, l'option **Sort… (Trier...)** du menu **Edit (Éditer)** permet de trier les échantillons (par ex. par on peut trier les échantillons (par ex. par **Sample Type (Type d'échantillon)** et par **Sample Name (Nom d'échantillon)**. Le fait de réorganiser les échantillons de sorte que chaque paire d'échantillons normaux et tumoraux apparaisse côté à côté dans la liste d'échantillons facilitera l'affichage et l'examen des échantillons avec le fichier de 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 soient imprimés sur la même page (voir l'étape 9.c).

8. Vérifier la qualité des échantillons témoins et des échantillons patient comme indiqué à la Section 6.3. Sélectionner les lignes contenant les échantillons témoins et les échantillons patient, et sélectionner l'icône Display Plots (Afficher les tracés) ( ) dans la barre d'outils pour afficher les électrophorégrammes et les données alléliques sous forme de tableau. Dans le menu déroulant Plot Setting (Réglage des tracés) 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 témoins avant d'examiner les échantillons patient. Les échantillons témoins sélectionnés en même temps que les échantillons patient sont affichés en permanence dans la fenêtre Samples Plot (Tracé des échantillons), et ne peuvent pas être réduits, ce qui encombre l'écran.

9. Vérifier le statut MSI des échantillons patient valides, comme indiqué aux Sections 6.4 et 6.5. Afficher les données des échantillons comme indiqué à l'étape 8. Pour faciliter l'interprétation des données, on peut exporter les données de mesure pour les analyser en aval de plusieurs manières, notamment comme indiqué 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 de Promega, ou envoyer un courriel à : **genetic@promega.com**

   a. Il est possible d'exporter un fichier texte contenant la taille des allèles filtrés et d'autres données d'échantillon, sous forme de Genotypes Table (Tableau des génotypes) comme indiqué ci-dessous :

      i. Depuis l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons témoins, puis sélectionner l'icône Display Plots (Afficher les tracés) ( ) de la barre d'outils pour ouvrir la fenêtre Samples Plot (Tracé des échantillons).

      ii. Si le Genotypes Table (Tableau des génotypes) n'apparaît pas sous le ou les électrophorégrammes, sélectionner l'icône Genotypes Table (Tableau des génotypes ( ) de la barre d'outils.

      iii. Sélectionner **Export Table (Exporter le tableau)** dans le menu **File (Fichier)**, puis enregistrer le fichier pour l'analyser en aval.

b. Il est possible d'exporter un fichier texte contenant la taille des allèles filtrés et d'autres données d'échantillon, sous forme de Report (Rapport) comme indiqué ci-dessous :

   i. Depuis l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons témoins, puis sélectionner l'icône Report Manager (Gestionnaire de rapports) ( ) de la barre d'outils pour ouvrir la fenêtre Report Manager (Gestionnaire de rapports).

   ii. Dans le menu déroulant Report Setting (Réglage de rapport) de la barre d'outils, sélectionner **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0**.

   iii. Sélectionner **Export... (Exporter...)** dans le menu **File (Fichier)**, nommer le fichier et sélectionner **Export (Exporter)**.

Remarque : on peut exporter plusieurs champs de données sous forme de Genotypes Table (Tableau des génotypes) plutôt que sous forme de Report (Rapport). Il est possible d'ajouter des champs en fonction des besoins spécifiques de votre laboratoire en éditant les fichiers Table Settings (Réglages de tableau) ou Report Settings (Réglages de rapport) OncoMate® fournis dans le GeneMapper® Manager.

c. Il est possible d'enregistrer au format .pdf un résumé des données avec les électrophorégrammes et les tailles d'allèles sous forme de tableau de la manière suivante :

   i. Depuis l'écran principal, sélectionner un ou plusieurs échantillons patient et échantillons témoins, puis sélectionner l'icône Display Plots (Afficher les tracés) ( ) pour ouvrir la fenêtre Samples Plot (Tracé des échantillons).

   ii. Sélectionner l'option **Print… (Imprimer...)** du menu **File (Fichier)**. Sélectionner **Microsoft Print to PDF (Microsoft Imprimer au format PDF)** (ou une option équivalente) comme Print Service (Service d'impression) et l'orientation **Landscape (Paysage)**. Sélectionner **Print (Imprimer)** 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 l'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, GeneMapper® Software fournit diverses options pour afficher et résumer les données d'échantillon. Vous trouverez informations supplémentaires sur l'examen des données dans le *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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System

L'analyse des produits de PCR de l'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 l'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 (Figure 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, tel que GeneMapper® Software, 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 sous forme de tableau pour l'interprétation du statut MSI en aval.

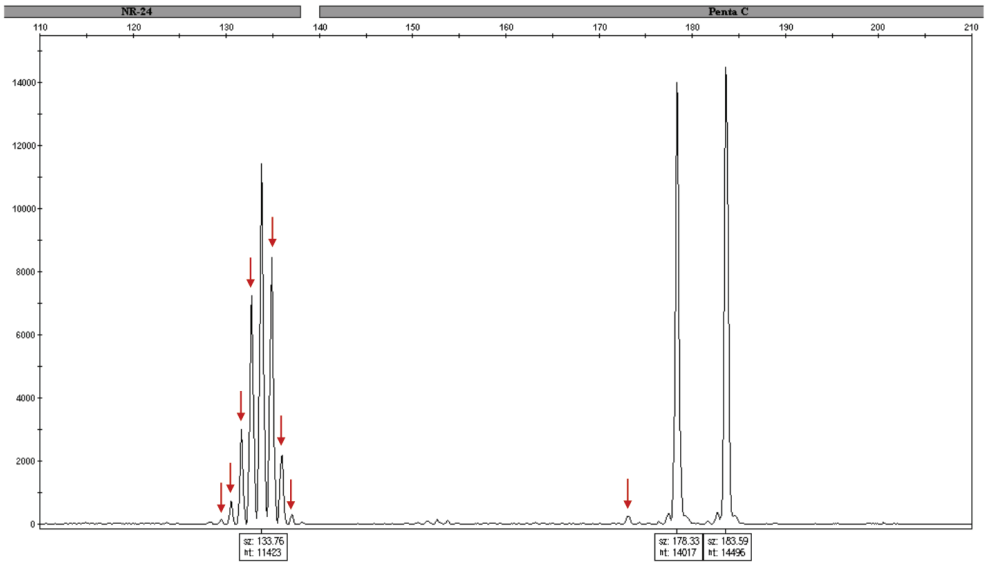


Figure 6. Les pics de « glissement » (indiqués par des flèches), générés par le glissement de la polymérase pendant l'amplification par PCR de répétitions en tandem courtes, sont clairement visibles au niveau des marqueurs de mononucléotides à des intervalles de 1 bp à partir du pic d'allèle le plus 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 (Figure 7). On détecte une différence de 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 ≥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).

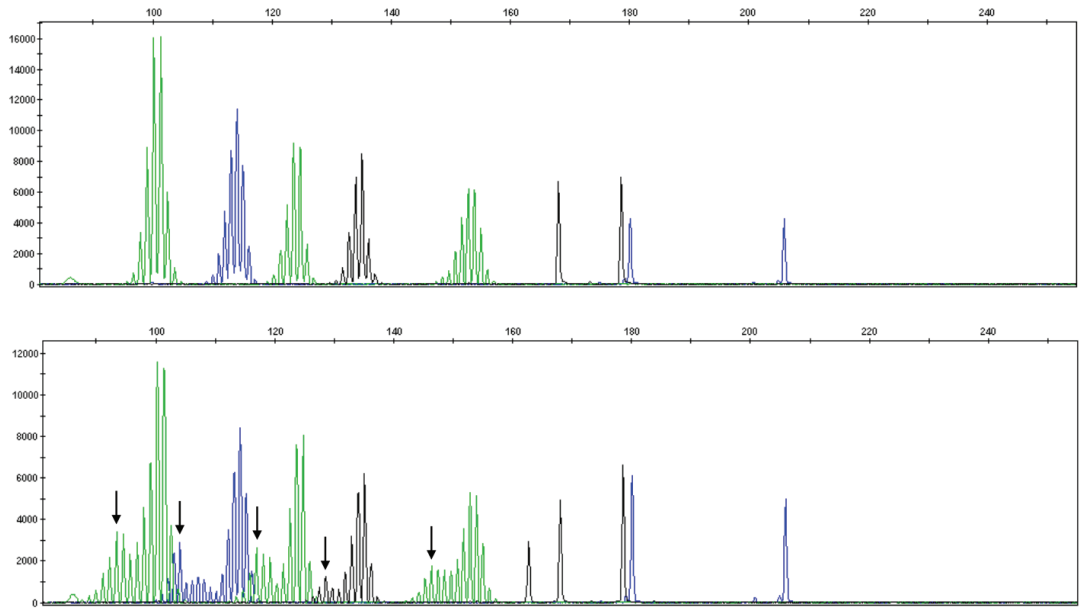


Figure 7. Les échantillons normaux (panneau du haut) et tumoraux (panneau du bas) appariés ont été analysés avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Un nanogramme d'ADN a été amplifié et analysé à l'aide de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec le POP-7® Polymer et un réseau capillaire 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 du POP-7® Polymer 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 (Figure 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.

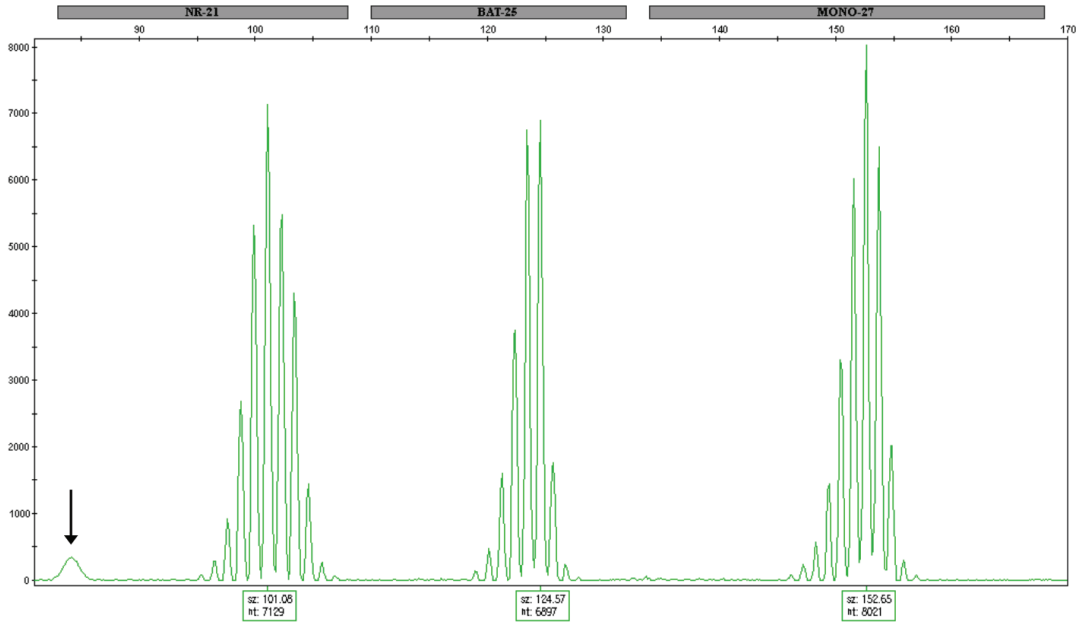


Figure 8. On peut observer un artefact d'amplification (indiqué par une flèche) dans le marqueur NR-21 sous la forme d'un pic large unique mesurant entre 83 bp et environ 90 bp. Ce pic ne devrait pas être considéré comme un allèle lorsque l'on détermine la stabilité du marqueur NR-21.

D'autres artefacts d'amplification peuvent se produire lorsque l'on introduit trop d'ADN dans l'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 l'analyse par GeneMapper® (voir 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 QC Sizing Quality (voir le Tableau 5) en raison de l'absence (ou de la mauvaise qualité) des pics de Size Standard 500. Sizing Quality (Qualité des mesures de taille) est une fonction de GeneMapper® Software 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. Un 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

Il est essentiel de comprendre la qualité des données de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System pour interpréter correctement le statut MSI d'un patient. Il faut mettre en place un ensemble de témoins d'essai (témoins positifs et négatifs) pour pouvoir se fier aux données acquises via cet essai 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 (QC) pour établir la fiabilité des données auprès de l'utilisateur (Tableau 5). La plupart des contrôles qualité (QC) 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 présente les types d'échantillons évalués pour chaque contrôle QC et l'impact d'un échec du contrôle QC. Suite à une évaluation QC des données, le statut de chaque échantillon patient affichera soit Invalid (Non valable), ce qui signifie que l'interprétation du statut MSI n'est pas possible en raison d'un échec critique du contrôle QC, soit Valid (Valable), ce qui signifie qu'aucun échec critique du contrôle QC n'a été observé, ou que malgré un échec du contrôle QC, l'interprétation du statut MSI du patient reste possible d'après les consignes de la Section 6.5.3. Lorsqu'un échantillon témoin échoue à certains contrôles QC des données, la qualité de tous les échantillons patient qui y sont associés peut être compromise, et le statut Invalid (Non valable) s'applique à tous les échantillons du lot. Lorsque les témoins positifs et négatifs ont réussi tous les tests QC, un échantillon patient peut réussir ou échouer à un test QC des données. Le statut de l'échantillon patient associé à un échec de QC repose sur le fait que l'échec concerne un témoin d'amplification positif ou négatif ou bien un échantillon patient. Les échantillons qui ne satisfont pas aux exigences de QC seront traités conformément aux consignes de la section Dépannage de ce manuel technique. Nous recommandons le processus de contrôle de la qualité des données suivant :

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

Promega

Tableau 5. Tests de QC des données à effectuer avant l'interprétation du statut MSI pour comprendre la qualité des données de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

				Statut de l'échantillon patient quand un échantillon témoin ou un échantillon patient échoue au test QC correspondant	
Section	**Test QC**	**Description du test QC**	**Échantillons évalués[1]**	**L'échantillon témoin échoue au QC[2]**	**L'échantillon patient échoue au QC[3]**
6.3.1	QC relatif aux mesures de taille	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 non valables	Échantillon non valable
6.3.2	QC de témoin négatif	Pour le témoin d'amplification négatif, aucun pic au-dessus du seuil d'analyse ne doit avoir été détecté.	–	Tous les échantillons non valables	Échantillons patient non évalués
6.3.3	QC de l'identité du témoin positif	Pour le témoin d'amplification positif, les allèles présents dans les marqueurs pentanucléotides doivent correspondre aux allèles attendus du 2800M Control DNA à 1,5 paire de bases près.	+	Tous les échantillons non valables	Échantillons patient non évalués
6.3.4	QC 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 non valables	Échantillon non valable
6.3.5	QC 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 non valables	Échantillon non valable
6.3.6	QC 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 n° 4	Voir la note de bas de page n° 4
6.3.7	QC relatif à l'amplification des allèles	Chaque marqueur doit comporter au moins un allèle supérieur au seuil d'analyse.	+, N, T	Tous les échantillons non valables	Marqueur non valable ; l'échantillon peut être interprété
6.3.8	QC 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 non valables	Échantillon non valable

Suite du tableau page suivante

				Statut de l'échantillon patient quand un échantillon témoin ou un échantillon patient échoue au test QC correspondant	
Section	**Test QC**	**Description du test QC**	**Échantillons évalués[1]**	**L'échantillon témoin échoue au QC[2]**	**L'échantillon patient échoue au QC[3]**
6.3.9	QC 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 bp près).	T	Témoins non évalués	Voir la note de bas de page n° 5
6.3.10	QC 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 de l'essai. L'intensité maximale exigée repose sur le seuil d'analyse et le contenu tumoral de l'échantillon.	T	Témoins non évalués	Marqueur non valable ; l'échantillon peut être interprété

[1] N, échantillon normal ; T, échantillon tumoral ; +, témoin positif ; –, témoin négatif.

[2] Résultat interprétatif du statut MSI pour tous les échantillons patient du lot lorsqu'un échantillon témoin présente le problème de QC 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 QC associé malgré l'échec d'un marqueur particulier. La consigne fournie exige que les échantillons témoins aient réussi tous les tests de QC. Voir les recommandations en matière d'interprétation à la Section 6.5.

[4] Indiquent que l'artefact de pic large connu mesurant entre 83 bp et 90 bp détecté dans le marqueur NR-21 pendant le QC des données n'est pas lié à l'instabilité. Il faut interpréter tous les échantillons comme étant non valables si un échantillon témoin 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 QC 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 mesure de tous les échantillons (QC Sizing Quality)

Des valeurs de qualité des mesures 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 des mesures de 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 qui présentant des problèmes Sizing Quality 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 (Figure 9). Évaluer la qualité des mesures de taille de chaque échantillon et témoin analysé, car les informations relatives à la taille sont essentielles pour le résultat du test.

Pour évaluer la qualité des mesures, s'assurer que le canal du fluorochrome Size Standard 500 (orange) s'affiche dans le logiciel d'analyse de fragments et représente 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 témoin n'est pas valable si l'un des attributs suivants (indiquant une mauvaise qualité des mesures de taille) est présent :

a. Le logiciel de collecte de données d'électrophorèse capillaire ou le logiciel d'analyse de fragments génère une alerte relative à la qualité des mesures.

   Remarque : on utilise uniquement les fragments Size Standard 500 mesurant entre 60 bp et 300 bp pour mesurer les marqueurs MSI. Les problèmes de qualité de mesure de la taille apparents relatifs aux pics Size Standard 500 supérieurs à 300 bp n'affectent pas les mesures des fragments.

b. Un ou plusieurs des 13 fragments 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 la mesure des fragments, à moins que le logiciel d'analyse de fragments ne les ait identifiées par erreur comme pics de l'étalon de taille.

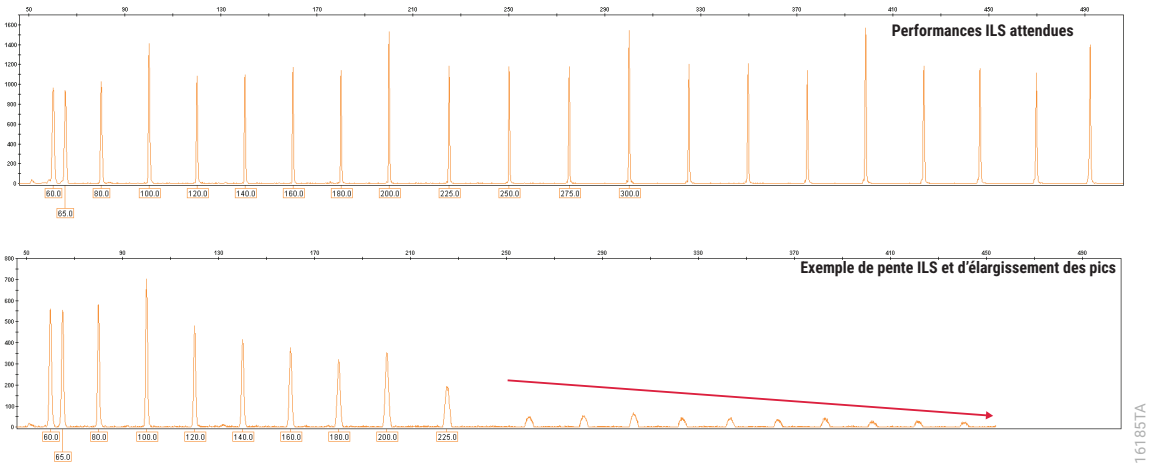


Figure 9. Le panneau du haut affiche les résultats escomptés pour le Size Standard 500. Sur le panneau du bas, on constate des baisses très prononcées et un élargissement des pics, ce qui indique un problème au niveau de la fonction Sizing Quality.

6.3.2 Évaluer la réaction du témoin d'amplification négatif (QC du témoin négatif)

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

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

Il faut analyser un échantillon témoin d'amplification positif (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 QC de l'identité du témoin positif avec les marqueurs Penta D et Penta C. L'échantillon témoin d'amplification positif 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 des performances (conditions énumérées aux Annexes B et C) :

a. Penta D : 193,5 à 196,5 et 199 à 202

b. Penta C : 176,5 à 179,5 et 182 à 185

Un témoin négatif qui ne satisfait pas à ces critères indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Il faut donc considérer comme non valables tous les échantillons patient analysés d'un lot dont l'échantillon témoin positif a échoué.

6.3.4 Évaluer les intensités de pic des résultats hors échelle (QC 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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System peuvent dépasser la limite supérieure du détecteur. Dans ce cas, l'appareil génère une alerte QC 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 (Figure 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 témoin doit être considéré comme non valable si l'on observe des résultats hors échelle. Les résultats hors échelle observés dans les témoins d'amplification positifs 2800M indiquent un problème systémique lors de la préparation ou de l'amplification des réactions de l'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 témoin positif échoue au QC 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 témoin d'amplification 2800M.

6.3.5 Évaluer tous les marqueurs pour identifier une interférence spectrale (QC 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 QC.

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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System sont indiqués à l'Annexe C.

Étant donné que les pics 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. La présence de signaux d'infiltration dans les témoins d'amplification positifs 2800M indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons à tester. Les échantillons patient ou échantillons témoins concernés doivent donc 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 témoin d'amplification positif. Pour identifier la présence éventuelle de pics d'infiltration dans les échantillons, afficher tous les canaux de fluorochrome qui figurent sur le même tracé (Figure 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 de l'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 sur le panneau du marqueur NR-21 ou du marqueur BAT-25.

b. Les pics du marqueur Penta D sont observables sur le panneau du marqueur BAT-25 ou du marqueur MONO-27.

c. Les pics du marqueur NR-21 sont observables sur le panneau du marqueur BAT-26 ou du marqueur NR-24.

d. Les pics du marqueur BAT-25 sont observables sur le panneau du marqueur BAT-26, du marqueur Penta D ou du marqueur NR-24.

e. Les pics du marqueur MONO-27 sont observables sur le panneau du marqueur Penta D, du marqueur NR-24 ou du marqueur Penta C.

f. Les pics du marqueur NR-24 sont observables sur le panneau du marqueur NR-21, du marqueur BAT-25 ou du marqueur MONO-27.

g. Les pics du marqueur Penta C sont observables sur le panneau du marqueur MONO-27.

Promega

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.

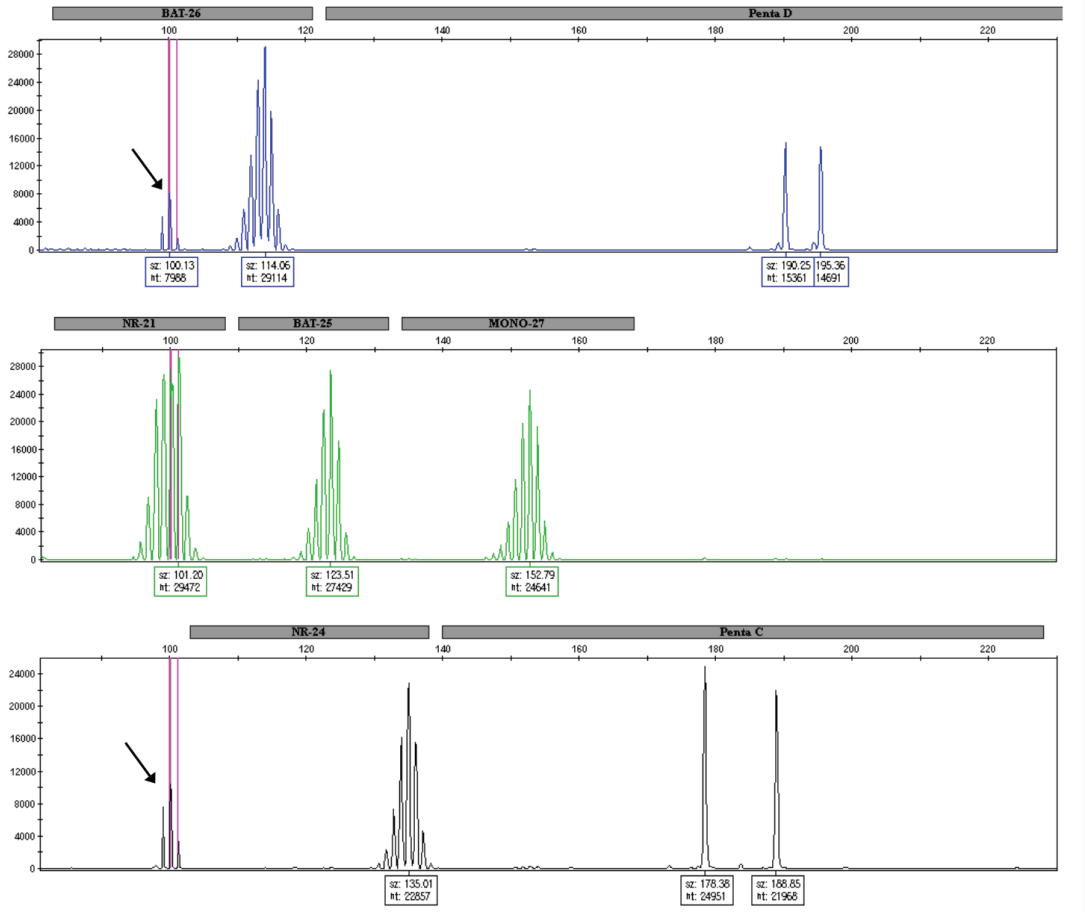


Figure 10. Échantillon de tissu hors échelle, avec infiltration du signal bien visible entre les canaux de fluorochrome. Les pics du marqueur NR-21 dépassent la limite de détection de l'appareil d'électrophorèse capillaire, générant ainsi une alerte « hors échelle » et un pic d'infiltration de forme similaire pour les autres marqueurs. **Panneau A.** Marqueurs du canal bleu ; mise en évidence d'un groupe de pics de signal du marqueur NR-21 infiltrant le marqueur BAT-26. **Panneau B.** Marqueurs du canal vert ; mise en évidence des pics de fragment hors échelle du marqueur NR-21. **Panneau C.** Marqueurs du canal jaune/noir ; les pics d'infiltration du marqueur NR-21 pénétrant ce canal sortent du panneau.

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

Des pics de fragment larges sont parfois observés dans l'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 bp. 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 de l'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 génèrera peut-être une alerte QC.

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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System sont indiqués à l'Annexe C (Section 11.3).

Inspecter les échantillons patient et échantillons témoins 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 QC 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 réduite. 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 témoins indiquent potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les lots dont un échantillon témoin échoue au QC 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 (QC relatif à l'amplification des allèles)

Inspecter les échantillons patient et les témoins 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 réduite. Documenter les marqueurs pour lesquels le QC 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 un 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 témoins d'amplification positifs 2800M indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les lots dont un échantillon témoin positif échoue au QC 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 témoin d'amplification positif et les échantillons patient normaux pour détecter une éventuelle contamination de l'ADN (QC 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 témoin d'amplification positif et les échantillons patient normaux. Le QC 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 QC relatif à la contamination de l'ADN) n'est pas informative. Un échec de l'échantillon témoin positif 2800M indique potentiellement des problèmes de qualité des données sur l'ensemble du lot d'échantillons. Les lots dont un échantillon témoin positif échoue au QC relatif à la contamination de l'ADN doivent être interprétés comme non valables et traités conformément aux consignes de la Section 9. Les échantillons patient normaux qui échouent au QC 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 (QC 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 QC 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 QC 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 QC 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 QC 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 QC de l'identité de l'échantillon patient n'implique pas d'évaluer les témoins positifs et négatifs.

6.3.10 Évaluer les marqueurs de répétition de mononucléotides des échantillons tumoraux pour déterminer leur signal (QC 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 des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, nous avons déterminé que le seuil d'analyse était de 175 RFU avec un contenu tumoral minimum de 20 %, correspondant à une fraction tumorale de 0,2. Pour garantir la sensibilité de l'essai, 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). Cela garantit 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 QC 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 QC du signal de l'échantillon tumoral n'implique pas d'évaluer les témoins positifs et négatifs.

6.4 Détermination de la stabilité des marqueurs de répétition de mononucléotides

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 diffèrent 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 à la Figure 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 QC des données (Section 6.3).

Lors de l'évaluation des performances de l'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 (≥2,75 bp dans la pratique pour tenir compte de la précision de mesure de l'appareil d'électrophorèse capillaire), le marqueur a été interprété comme instable.

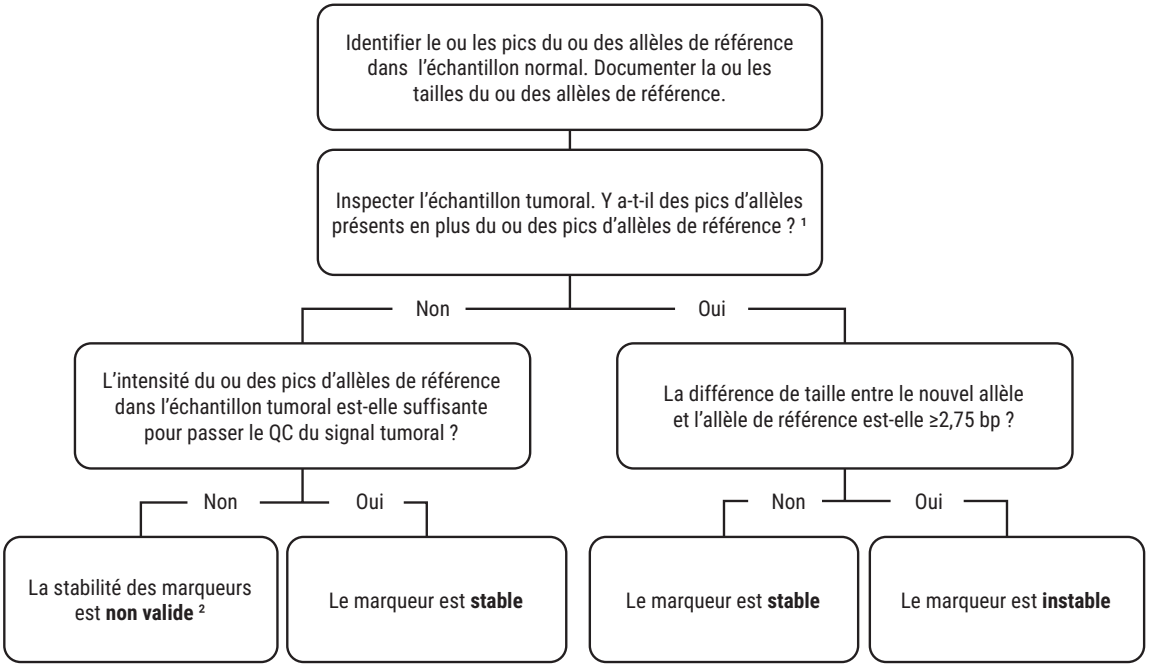
Tableau 6. Détermination des valeurs de stabilité des marqueurs de répétition de mononucléotides en comparant les allèles présents dans les échantillons normaux et tumoraux.

Qualification de la valeur de stabilité des marqueurs

Qualification de la valeur de stabilité attribuée à chaque marqueur pour l'échantillon

Valeur	Description
Stable	Aucune instabilité des microsatellites n'a été détectée pour le marqueur de répétition de mononucléotides. Aucun nouvel allèle n'a été détecté dans l'échantillon tumoral, ou 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 pour le marqueur de répétition de mononucléotides. Un nouvel allèle a été détecté dans l'échantillon tumoral, et la différence de taille entre cet allèle et l'allèle de référence normal était significative (≥2,75 bp).
Non valable	Il n'a pas été possible d'évaluer l'instabilité des microsatellites pour le marqueur de répétition de mononucléotides. La qualité des données de l'échantillon était inacceptable en raison d'un échec critique du QC (voir la Section 6.3).

Pour chaque marqueur de répétition de mononucléotides qui passe le QC :



1. Les échantillons tumoraux se composent généralement d'un mélange de cellules normales et de cellules tumorales ; la présence de l'allèle de référence normal dans l'échantillon tumoral est courante.
2. Vous trouverez des informations supplémentaires à la Section 9 Dépannage.

16187MA

Figure 11. Consignes générales 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 QC des données spécifiées à la Section 6.3. Documenter la stabilité de chaque marqueur, puis passer à la Section 6.5, Interprétation du statut MSI d'une tumeur. **Remarque :** pour qu'un marqueur de répétition de mononucléotides puisse être interprété, tous les contrôles QC dans les échantillons normaux et tumoraux doivent être réussis.

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 l'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). En l'absence d'échec critique du QC, on interprète le statut MSI de l'échantillon de la manière suivante :

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 (Boland, 1998 ; Hampel, 2008 ; Umar, 2004).

Il reste possible de déterminer le statut MSI lorsque l'on obtient des résultats non valables pour un sous-ensemble de marqueurs (voir la Section 6.5.2) ou en cas d'échec du QC de l'identité de l'échantillon patient (voir la Section 6.5.3). Les consignes pour interpréter ce type d'échantillon sont présentées ci-dessous. Les échantillons qui présentent 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. Statut MSI de la tumeur déterminé 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 (MSI high) 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 est inacceptable en raison d'un échec critique du QC des données (voir le Tableau 5). Il n'est pas possible de déterminer le statut MSI à partir de ces données. Lors de l'échec du QC des données d'un lot en raison d'un problème avec le témoin d'amplification positif ou négatif, tous les échantillons de ce lot doivent être interprétés comme non valables. Vous trouverez des consignes sur la résolution des échecs de QC occasionnant des résultats non valables dans la section Dépannage de ce manuel.

Interprétation du statut MSI de chaque échantillon de patient :

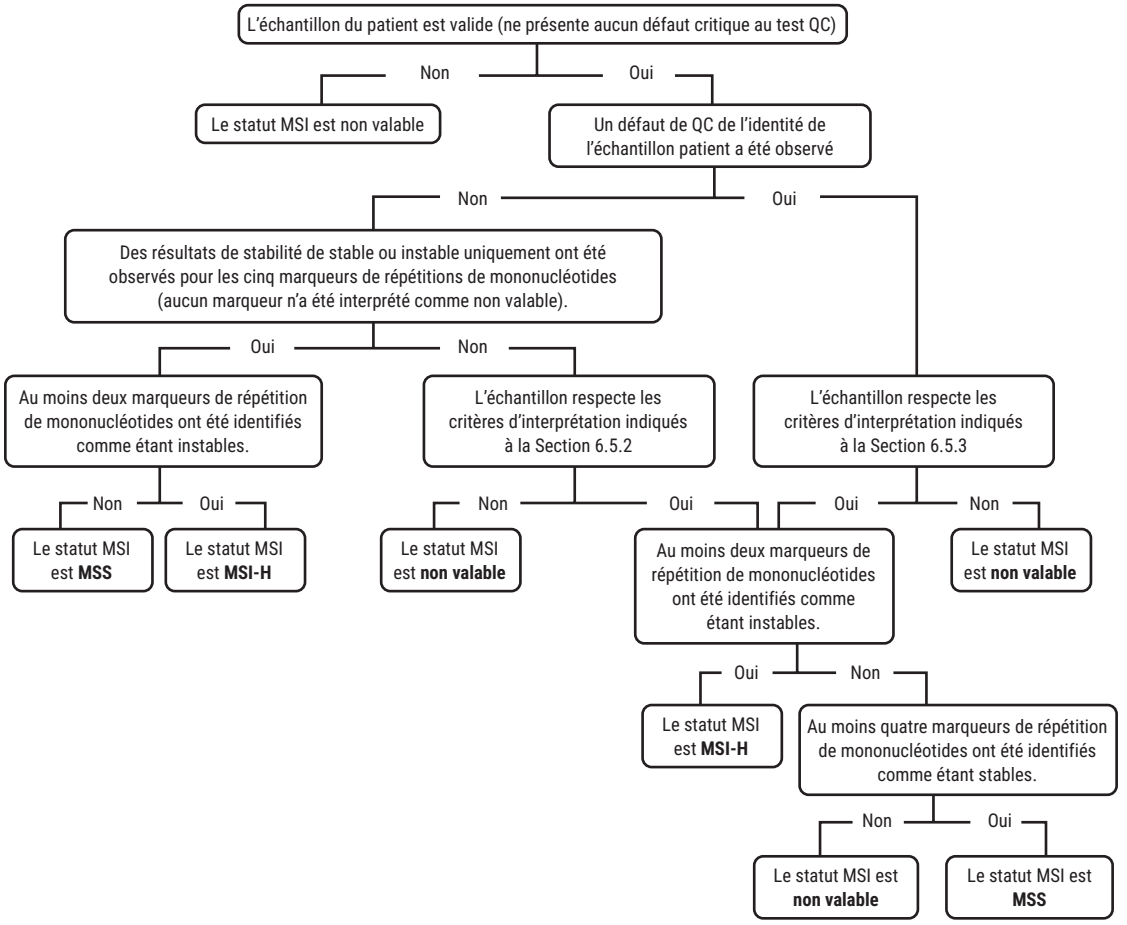


Figure 12. Consignes générales pour déterminer le statut MSI d'un échantillon tumoral. Suivre l'organigramme pour chaque échantillon qui réussit le QC des données.

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, le QC du signal de l'échantillon tumoral et le QC relatif à l'amplification des allèles échouent et le statut de stabilité des marqueurs est « non valable ». Lorsqu'un pic large interfère avec la mesure des pics d'allèles, le QC relatif aux pics larges de l'échantillon échoue et le statut de stabilité des marqueurs est « 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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, ou b) en réanalysant une section de tissu FFPE différente.
2. Il n'a pas été observé d'échec des QC des marqueurs de répétition de pentanucléotides.
3. Les seuls échecs des QC des données concernent le CQ du signal de l'échantillon tumoral, le CQ QC du signal de l'échantillon tumoral, le QC relatif à l'amplification des allèles et le QC relatif aux pics larges.
4. Une valeur stable ou instable a pu être établie pour au moins deux marqueurs de répétition de mononucléotides.

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

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

6.5.3 Interprétation du statut MSI en cas d'échec du QC de l'identité de l'échantillon patient

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 dans 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, qui 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 d'allèles différent dans un échantillon tumoral par rapport à l'échantillon normal correspondant. La présence d'allèles supplémentaires dans un échantillon tumoral n'entraîne pas d'échec du QC 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 en cas de perte de l'un des allèles pentanucléotidiques normaux 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). Il peut alors sembler que le QC de l'identité de l'échantillon patient échoue. 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 au-dessus du pic potentiellement « perdu » dans le logiciel GeneMapper®, une ligne noire verticale apparaît pour indiquer que le pic dépassait le seuil d'analyse, mais qu'il a été filtré et n'a donc pas été identifié comme un allèle (Figure 13). Vous pouvez également zoomer sur un pic potentiellement « perdu » pour vous 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 dont le QC de l'identité semble avoir échoué si les conditions suivantes sont réunies :

1. L'échec du QC 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 panneau.
3. Il n'a pas été observé d'échec de QC au niveau des marqueurs de répétition de mononucléotides.

Si ces conditions sont remplies, on peut interpréter les données en respectant es consignes suivantes :

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

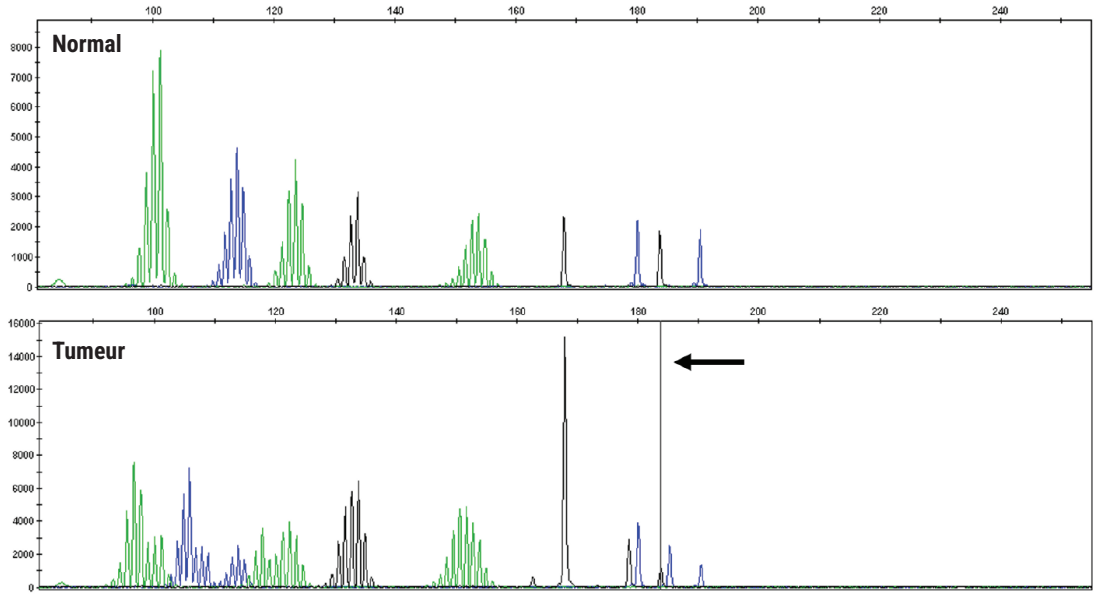


Figure 13. Un exemple de déséquilibre allélique prononcé. En cas de déséquilibre allélique prononcé dans les marqueurs de répétition de pentanucléotides, lorsque l'on place le curseur sur un pic normal « perdu » dans l'électrophorégramme de l'échantillon tumoral, une ligne noire verticale s'affiche si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

7. Contrôles qualité de l'essai

7.1 Calibration spectrale

Pendant l'électrophorèse capillaire, les produits d'amplification de l'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. L'OncoMate® 5C Matrix Standard (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 le fichier de calibration spectrale généré, il 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 légères modifications de 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 pour tenir compte des potentielles variations d'un cycle à l'autre.

7.3 Témoins positifs et négatifs

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

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

[1]Les tailles des allèles ont été déterminées à l'aide de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec du POP-7® Polymer 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.

[2]Les performances des appareils d'électrophorèse capillaire varient d'un appareil à l'autre et 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 témoins analysés doivent contenir le Size Standard 500. Le 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, 475, 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 de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System pendant l'électrophorèse capillaire. On utilise le Size Standard 500 pour attribuer des tailles aux produits amplifiés de chaque échantillon et de chaque témoin à l'aide de la méthode de Local Southern (Southern, 1979). L'étalon de taille contrôle les variations de précision des mesures entre les capillaires 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 des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, nous avons déterminé que le seuil d'analyse était 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 mesure des fragments à identifier un allèle. D'après une caractérisation pathologique standard, le contenu tumoral doit être ≥20 %, et la quantité de cellules nucléées doit être suffisante. On ne peut pas utiliser les échantillons tumoraux qui ne respectent pas ces critères avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été évalué avec de l'ADN d'entrée purifié provenant d'échantillons de tissu intestinal FFPE à l'aide du Maxwell® CSC Instrument Maxwell® CSC FFPE DNA Kit, puis les produits d'amplification ont été analysés à l'aide de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec GeneMapper® Software version 5.0. Avant d'utiliser d'autres méthodes d'extraction d'ADN, appareils d'électrophorèse capillaire, logiciels d'analyse de fragments ou méthodes d'analyse, l'utilisateur doit déterminer si ces méthodes sont compatibles avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été conçu pour être utilisé avec de l'ADN extrait d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) de patients atteints par un cancer colorectal. Les performances avec l'ADN d'autres types d'échantillons ou de fixatifs n'ont pas été déterminées.

Le logiciel de mesure des fragments propose diverses fonctionnalités permettant d'identifier un allèle tumoral modifié ou la présence de marqueurs microsatellites. Pour une interprétation exacte, il convient de comparer l'échantillon tumoral à un échantillon de tissu normal du même patient.

Les locus microsatellites compris dans le système sont quasi-monomorphes. Des allèles hétérozygotes ont été observés dans de rares cas. Pour une interprétation exacte, il convient de comparer l'échantillon tumoral à un échantillon de tissu normal du même patient.

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

Les performances cliniques de ce dispositif pour guider les décisions de traitement des patients MSI-H ou MSS n'ont pas été déterminées.

9. Dépannage

Pour les questions qui n'ont pas été abordées ici, consulter le manuel d'utilisation de l'appareil ou accessoire correspondant ou contacter votre succursale ou distributeur local Promega. Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : **www.promega.com** ou par e-mail : **genetic@promega.com**

Symptômes	Causes et commentaires
Les fragments de Size Standard 500 étaient de faible résolution, il y avait moins de fragments que prévu ou les intensités de pic étaient faibles, ce qui a fait échouer le QC Sizing Quality (les amplicons peuvent également être affectés).	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 témoins positifs et négatifs.
	Présence de contaminants ou de dépôts cristallins dans le polymère. Lorsqu'il faut ajouter du polymère, veiller à ce qu'il ait été porté à température ambiante conformément aux consignes du fabricant. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les témoins positifs et négatifs.
	Un ou plusieurs capillaires étaient bloqués. Remplir le réseau capillaire et refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les témoins positifs et négatifs. Il sera peut-être nécessaire d'installer un nouveau réseau capillaire.
	Il n'a pas été ajouté de Size Standard 500 au cocktail de chargement d'électrophorèse capillaire. Préparer à nouveau du cocktail de chargement d'électrophorèse capillaire avec du Size Standard 500 et refaire l'électrophorèse capillaire pour tous les échantillons et témoins.
	Les extrémités des capillaires n'étaient pas en contact avec le cocktail de chargement. S'assurer que chacun des puits réservés de la plaque à 96 puits contienne 11 µl du mélange cocktail-échantillon et que la plaque ait été brièvement centrifugée avant le début du cycle d'électrophorèse capillaire. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les témoins positifs et négatifs. Examiner l'électrophorégramme pour déterminer ce qui a déclenché l'alerte de QC Sizing Quality.

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 consommables de l'appareil étaient périmés ou ont atteint la limite d'échantillonnage. Remplacer le ou les consommables périmés ou épuisés, puis redémarrer le cycle d'électrophorèse capillaire.
Des pics inattendus ont été détectés dans le canal de fluorochrome de Size Standard 500, ce qui a entraîné l'échec du QC Sizing Quality.	Artefacts liés à l'électrophorèse capillaire. On peut observer des pics aberrants pendant l'électrophorèse capillaire. Lorsque ces pics affectent le canal orange, cela peut obscurcir les pics de Size Standard 500, ou le logiciel d'analyse des fragments peut attribuer des tailles inexactes. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire pour les échantillons affectés, y compris les témoins positifs et négatifs. Remplacer les consommables d'électrophorèse capillaire si le problème persiste. Examiner l'électrophorégramme pour déterminer ce qui a déclenché l'alerte de QC Sizing Quality.
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).	La solution mère de 2800M Control DNA ou la dilution du 2800M Control DNA n'a pas été suffisamment agitée à l'agitateur vortex. Des pics d'intensité faible ou excessive peuvent être observés, y compris l'amplification excessive des allèles Penta D. Refaire les réactions d'amplification et l'analyse d'électrophorèse capillaire, y compris les témoins 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 témoins 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 témoin positif et un nouveau témoin négatif.

Symptômes	Causes et commentaires
Pics de hauteur faible dans les échantillons normaux ou tumoraux. Le QC du signal de l'échantillon tumoral des échantillons tumoraux a peut-être échoué.	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 quantifié et dilué avec précision, 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 l'essai 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 des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été effectuée avec de l'ADN purifié provenant d'échantillons de tissu CCR FFPE à l'aide du Maxwell® CSC Instrument et du Maxwell® CSC FFPE DNA Kit. Les autres méthodes ne fourniront peut-être pas la même qualité d'ADN.
	Mauvaise injection pendant l'électrophorèse capillaire (les pics de Size Standard 500 sont également affectés). Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire des échantillons affectés et des témoins positifs et négatifs.
	Du formamide de mauvaise qualité a été utilisé. Utiliser uniquement du formamide Hi-Di™ 3500 Dx Series.
	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 la Nuclease-Free Water pour diluer la matrice d'ADN.

Symptômes	Causes et commentaires
Pics de hauteur faible dans les échantillons normaux ou tumoraux. Le QC du signal de l'échantillon tumoral des échantillons tumoraux a peut-être échoué. (suite)	Problèmes au niveau du thermocycleur ou de la plaque de réaction (la réaction du témoin positif a également été affectée). Confirmer que le programme de PCR ne comprend pas d'erreur et que le thermocycleur sélectionné répond aux exigences de l'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, juste avant l'électrophorèse.
	ADN dégradé ou de mauvaise qualité. La fixation inadéquate ou prolongée des échantillons inclus en paraffine peut produire de faibles quantités d'ADN ou de l'ADN de mauvaise qualité. Un stockage inapproprié de 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 à partir d'une autre section de tissu.
	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.

Symptômes	Causes et commentaires
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 quantifié et dilué avec précision. Refaire l'amplification en utilisant 1,0 ng de matrice d'ADN si une erreur de quantification a été constatée. Autrement, adopter l'une des approches suivantes : 1) refaire la réaction d'amplification avec une quantité d'ADN inférieure, 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 d'ADN inférieure, 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 d'ADN inférieure. Il sera peut-être nécessaire de repréparer et réanalyser l'ADN à partir d'une autre section de tissu.

Symptômes	Causes et commentaires
Des pics inattendus étaient visibles dans une ou plusieurs couleurs de fluorochrome.	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 au-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.
	ADN en trop grande quantité. 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 plus grand nombre 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 quantifié et dilué avec précision. Refaire l'amplification avec 1,0 ng de matrice d'ADN. Si le problème persiste, refaire l'amplification en utilisant une quantité d'ADN inférieure.
	Les échantillons n'ont pas été dénaturés correctement 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, juste 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 soit porté à température ambiante avant l'installation et l'utilisation. Refaire les injections. Refaire l'amplification et l'électrophorèse capillaire si le problème persiste.
	Échantillon témoin 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 identifiés et étiquetés correctement. Refaire l'amplification et l'analyse par électrophorèse capillaire des échantillons concernés pour confirmer la source présumée du problème.

Symptômes	Causes et commentaires
Amplification préférentielle des petits marqueurs.	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 avec 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 à partir d'une autre section de tissu. Si le problème persiste, la qualité de l'échantillon de tissu FFPE est peut-être 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 du rendement. Vérifier que le 2800M Control DNA et les échantillons d'ADN FFPE sont conservés dans des conditions adéquates. Refaire la réaction d'amplification avec 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 à partir d'une autre section de tissu. Si le problème persiste, la qualité de l'échantillon de tissu FFPE est peut-être trop faible pour que l'analyse réussisse.
	Matrice d'ADN en quantité insuffisante. S'assurer que l'ADN est quantifié et dilué avec précision, puis refaire l'amplification en utilisant 1,0 ng de matrice d'ADN si une erreur de quantification a été constatée. Si le problème persiste, refaire la réaction d'amplification avec une plus grande quantité d'ADN ou préparer à nouveau l'ADN à partir d'une autre section de tissu.

Symptômes	Causes et commentaires
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 pour l'analyse. S'assurer que les échantillons d'ADN normal et d'ADN tumoral ont été appariés correctement sur la plaque de PCR et pendant l'analyse d'électrophorèse capillaire. S'assurer que les échantillons ont été étiquetés correctement. Refaire l'analyse par électrophorèse capillaire des échantillons affectés en s'assurant qu'ils sont correctement appariés, sans oublier les réactions des témoins positifs et négatifs. Refaire les réactions d'amplification si le problème persiste.
	L'échantillon tumoral présente une perte d'hétérozygotie. Voir la Section 6.5.3 et la Figure 13 pour plus d'informations sur l'interprétation des données de ces échantillons tumoraux.

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif qui a entraîné, ou pourrait entraîner, le décès ou une grave blessure d'un utilisateur ou patient doit être signalé immédiatement au fabricant. Les utilisateurs installés dans l'Union Européenne devraient également signaler tout incident grave à l'Autorité Compétente de l'État Membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Promega

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. Boland, C.R. and Goel, A. (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–87.
3. 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.
4. Bregu J. *et al.* (2013) Analytical thresholds and sensitivity: Establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. *J. Forensic Sci.* **58**, 120–9
5. Cortes-Ciriano I. *et al.* (2017) A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat. Commun.* **8**, 15180.
6. Hampel, H. *et al.* (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5783–8.
7. Hause R.J. *et al.* (2016) Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat. Med.* **22**, 1342–50.
8. Ionov Y. *et al.* (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–61.
9. Latham A. *et al.* (2019) Microsatellite instability is associated with the presence of Lynch syndrome pan-cancer. *J. Clin. Oncol.* **37**, 286–95.
10. Le, D.T. *et al.* (2015) PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–20.
11. 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.
12. Southern, E.M. (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **100**, 319–23.
13. Stjepanovic, N. *et al.* (2019) Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* mdz233.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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

Un résumé de la sécurité et des performances (SSP, Summary of Safety and Performance) de ce produit est disponible, conformément à l'article 29 de la réglementation (UE) 2017/746. Ce SSP sera accessible au public dans EUDAMED une fois qu'EUDAMED sera entièrement fonctionnel. D'ici là, ce document est disponible sur demande directe auprès de Promega.

Les coordonnées sont disponibles à l'adresse : **www.promega.com** ; E-mail : **genetic@promega.com**

11.1 Annexe A

Les paramètres de calibration spectrale utilisés pour l'évaluation des performance de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System avec l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer figurent ci-dessous.

Voici les paramètres à utiliser pour effectuer la calibration spectrale avec les Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers :

Jeu de fluorochromes : AnyDye (3500 Series)

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 : 5 000

Limiter les analyses à : 6 500

Sensibilité : 0,4

Score de qualité minimal : 0,95

11.2 Annexe B

Les paramètres d'analyse de fragments utilisés pour l'évaluation des performance de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System avec l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer figurent ci-dessous.

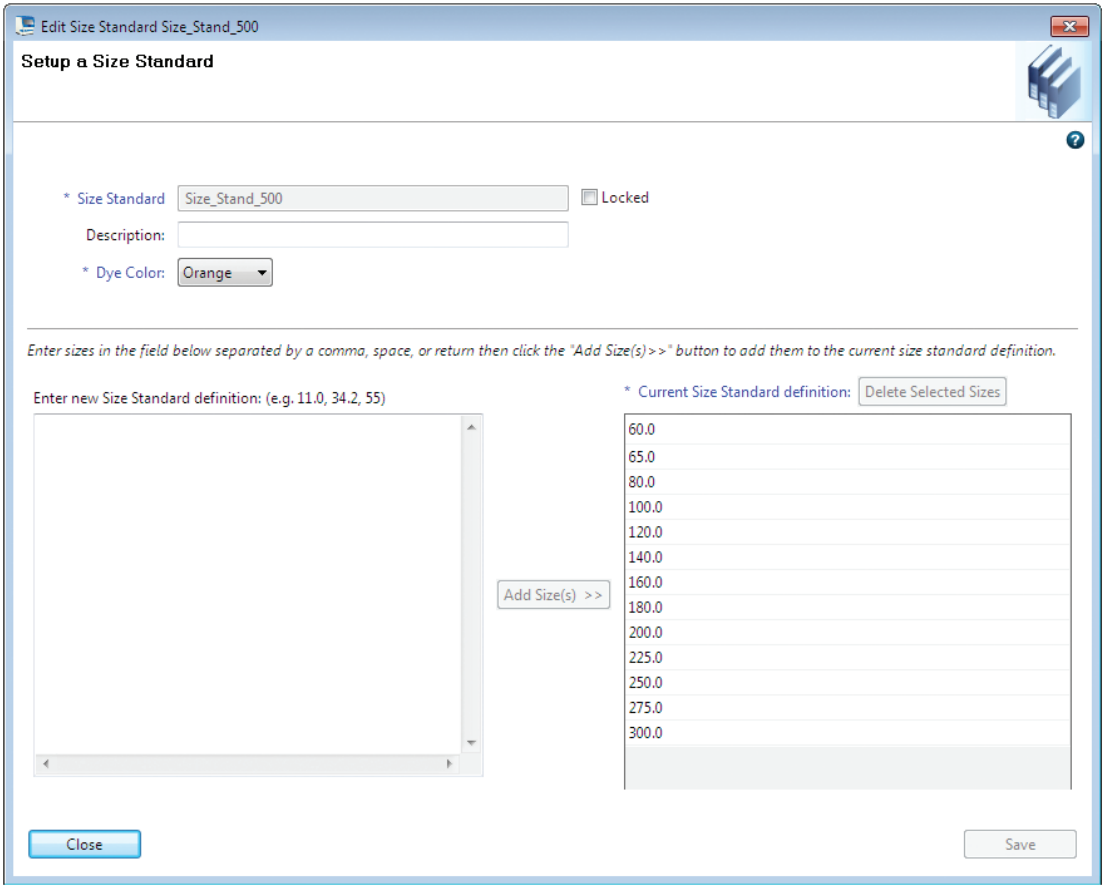
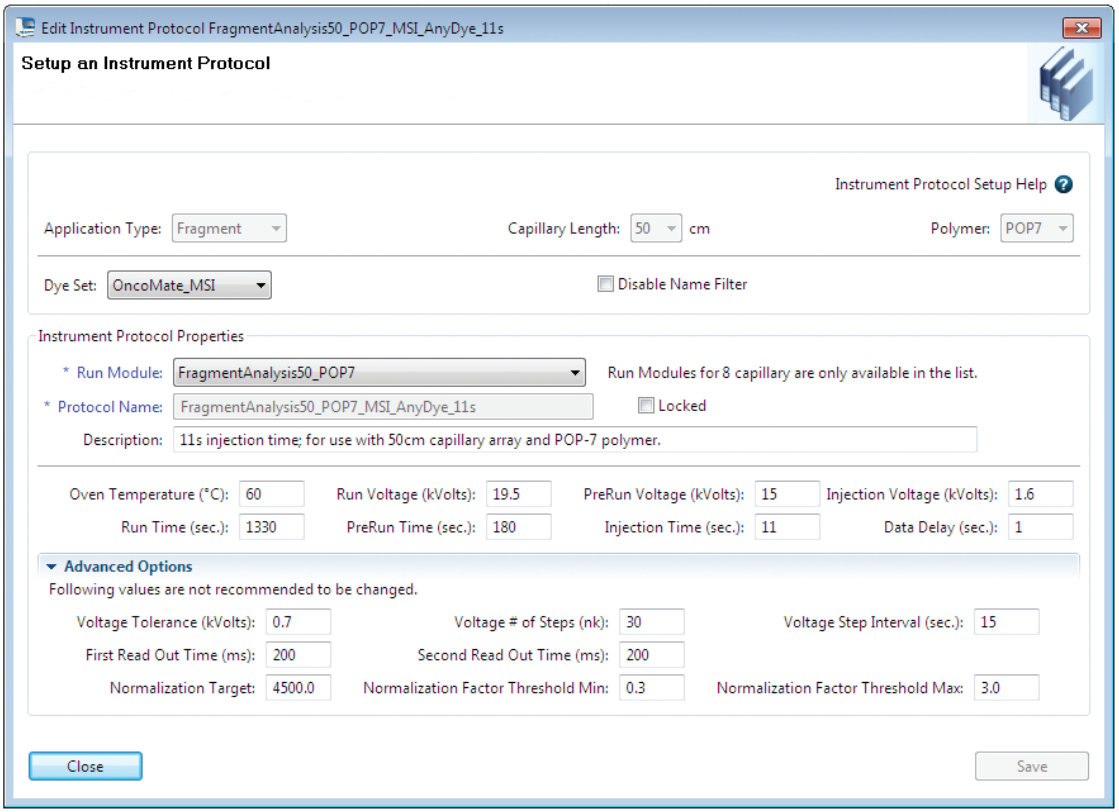


Figure 14. Définition de « l'étalon de taille » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.



16191TA

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

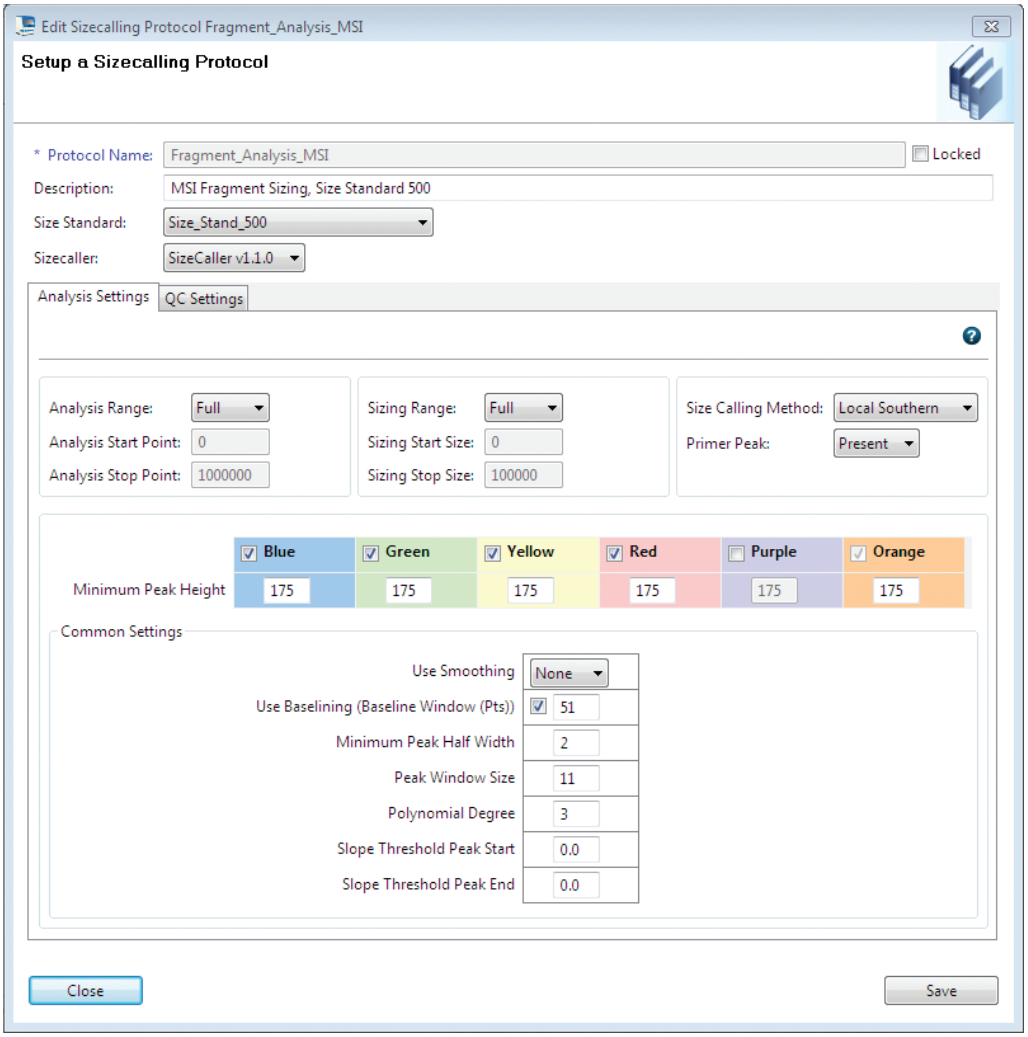


Figure 16. Paramètres du « protocole de détermination des tailles » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

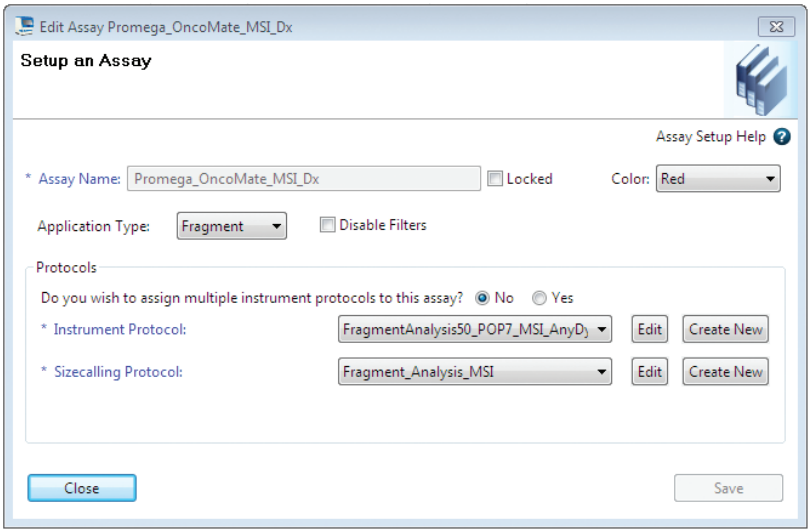


Figure 17. Paramètres d'« essai » de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

11.3 Annexe C

Paramètres d'analyse des données du GeneMapper® 5.0 utilisés pendant l'évaluation des performances de l'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 du POP-7® Polymer. Les utilisateurs qui analysent les produits amplifiés de l'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 l'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 GeneMapper® Software 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, Figure 19). Pour plus d'informations, se reporter à la documentation des versions 5.0 et 6.0 de GeneMapper® Software.

1. Ouvrir GeneMapper® Software, version 5.0 ou 6.0.
2. Sélectionner **Tools (Outils)**, puis **Panel Manager (Gestionnaire des panels)**.
3. Sélectionner **Panel Manager (Gestionnaire des panels)** dans le volet en haut à gauche (Figure 18).
4. Dans le menu, sélectionner **File (Fichier)**, puis **Import Panels (Importer les panels)**. L'icône du gestionnaire des panels doit être sélectionnée (surlignée en bleu) pour que l'option **Import Panels (Importer les panels)** soit accessible.
5. Naviguer jusqu'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 cliquer sur **Import (Importer)**.
6. En bas de la fenêtre du gestionnaire des panels, sélectionner **Apply (Appliquer)** puis **OK**.
7. Sélectionner **Tools (Outils)**, puis **GeneMapper Manager (Gestionnaire de GeneMapper)**.
8. Sélectionner l'onglet Size Standards (Étalons de taille), puis sélectionner **Import (Importer)** en bas de la fenêtre du gestionnaire de GeneMapper.
9. Naviguer jusqu'à l'emplacement où le fichier des étalons de taille a été enregistré sur l'ordinateur. Sélectionner le fichier **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0**, puis cliquer sur **Import (Importer)**.
10. Laisser le gestionnaire de GeneMapper 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 **Done (Terminé)** en bas de la fenêtre du gestionnaire de GeneMapper.

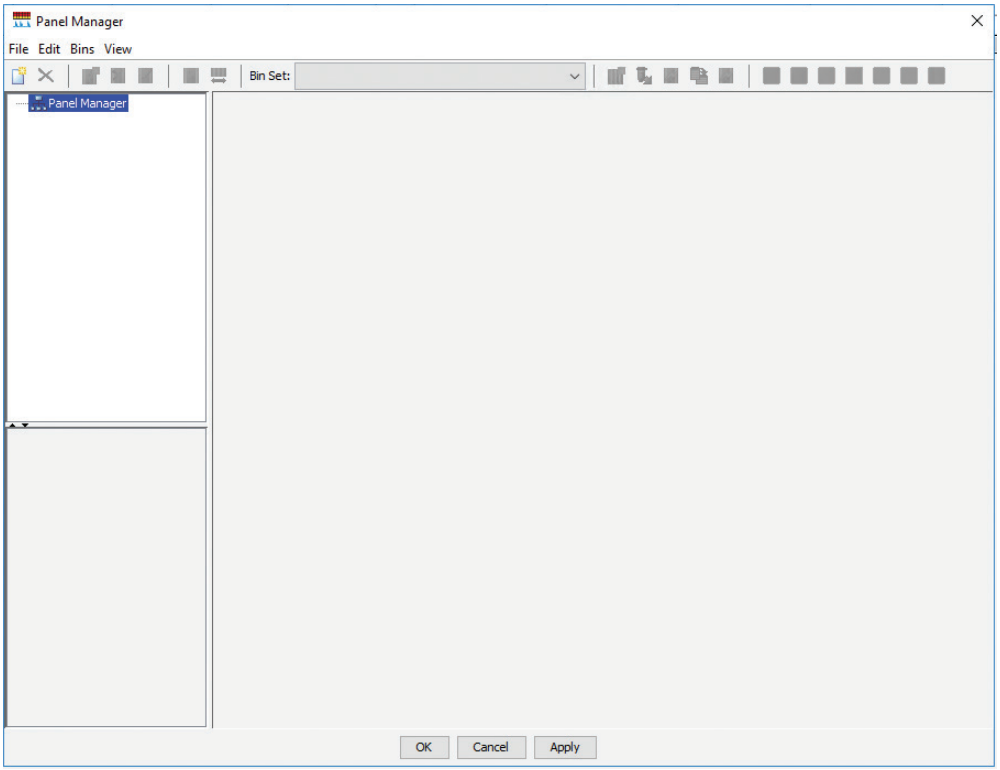


Figure 18. La fenêtre GeneMapper® Panel Manager l'icône Panel Manager (Gestionnaire des panels) sélectionnée. L'option Import Panels (Importer les panels) (étape 4) est accessible depuis le menu File (Fichier) lorsque l'icône du gestionnaire des panels est sélectionnée (surlignée en bleu).

Tableau 9. Définition des panels de marqueurs.

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

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

[2]Le 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. Le Size Standard 500 contient des pics de fragment allant de 60 à 500 bp, bien que l'analyse des pics de fragments mesurant entre 60 et 300 bp soit suffisante pour mesurer les fragments de l'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

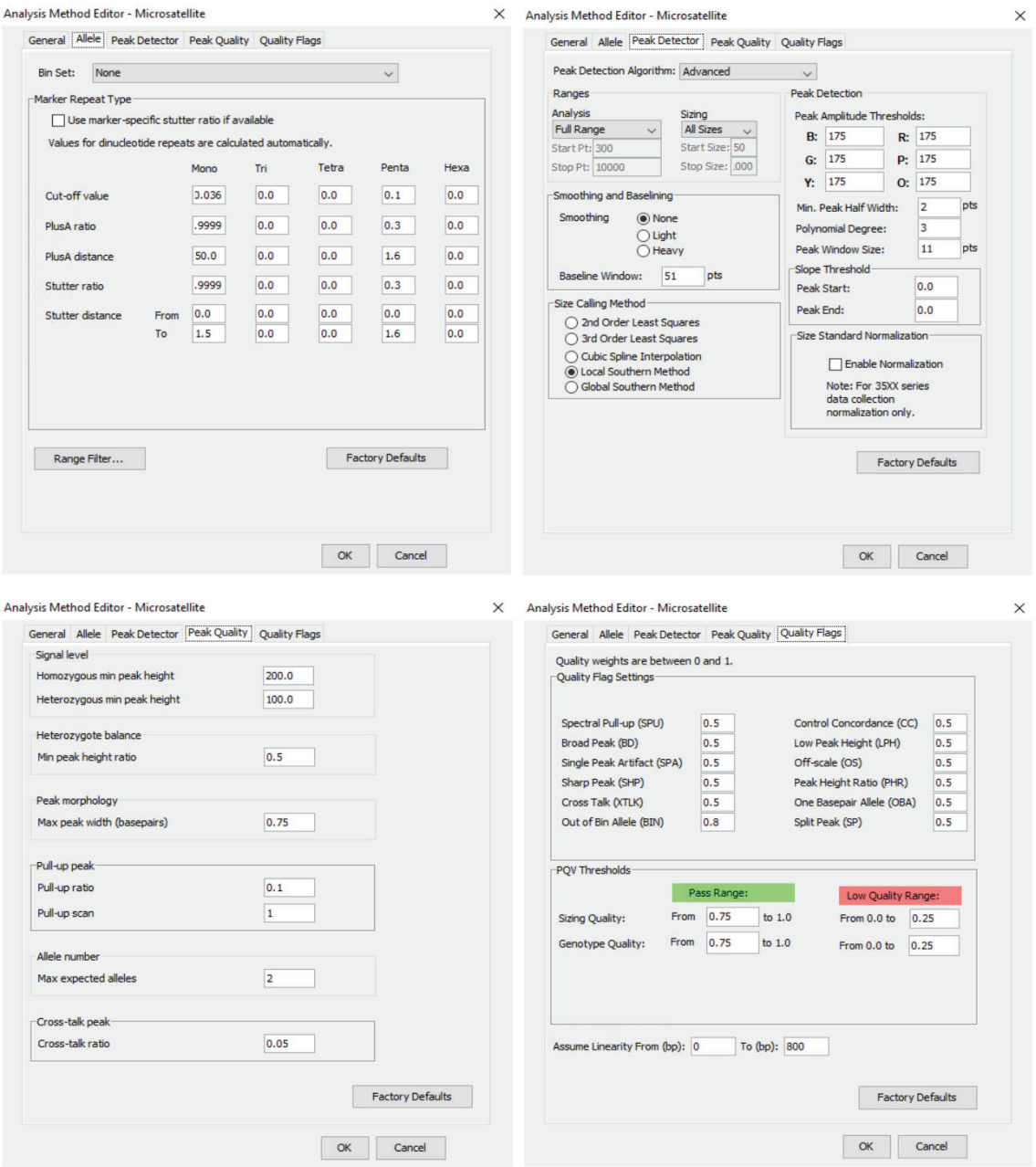


Figure 19. Paramètres d'analyse utilisés pour l'évaluation des performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

16195TA

12. Performances analytiques

Toutes les études analytiques ont suivi la procédure décrite dans le *Manuel technique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System* #TM595. Les matériaux et les équipements utilisés dans le cadre de cette procédure étaient conformes aux exigences répertoriées dans ce Manuel technique. En particulier, l'ADN extrait dans le cadre de ces études l'a été au moyen du Maxwell® CSC Instrument et du Maxwell® CSC DNA FFPE Kit, et l'ADN a été quantifié au moyen du QuantiFluor® dsDNA System. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés et détectés au moyen de l'Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer avec du POP-7® Polymer et un réseau capillaire de 50 cm. Enfin, les données ont été analysées à l'aide d'un logiciel qui n'est pas disponible en Europe. Une étude de concordance a donc été réalisée afin de comparer une autre méthode d'analyse des données qui utilise le logiciel GeneMapper® 5.0 pour mesurer les fragments et pour l'évaluation de la qualité des données de base avec le logiciel utilisé pour les études afin de démontrer leur équivalence.

12.1 Extraction de l'ADN

Il a démontré que le Maxwell® CSC DNA FFPE Kit et le Maxwell® CSC Instrument étaient appropriés pour procéder à l'extraction d'ADN en réalisant des extractions d'ADN à partir de boucles FFPE (tissus de 0,1 à 2,0 mm^3) obtenues à partir de trois échantillons de tumeurs MSI-H, de trois échantillons de tumeurs MSS et d'échantillons normaux correspondants. Le contenu tumoral des échantillons MSI-H était de 20 à 30 %, et contenu tumoral des échantillons MSS était de 20 à 60 %. L'extraction de l'ADN a été réalisée par chacun des deux opérateurs avec trois lots du Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Une alternance entre les lots du DNA FFPE Kit a été mise en place entre les opérateurs (par ex., l'Opérateur 1 utilisait le Lot 1 le Jour 1 et l'Opérateur 2 utilisait le Lot 2 le Jour 1). Une fois isolé, l'ADN extrait a été quantifié à l'aide du QuantiFluor® dsDNA System et amplifié à l'aide de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit. L'ADN amplifié a été soumis à l'électrophorèse capillaire à l'aide d'un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer et analysé à l'aide d'un logiciel d'analyse des fragments.

Dans cette étude, 96,4 % (81/84) des boucles FFPE individuelles extraites ont produit des résultats concordants avec le statut MSI prédéterminé. Les intervalles de confiance (CI) de 95 % pour les pourcentages de résultats corrects et incorrects étaient respectivement de 89,9 à 99,3 % et de 0,7 à 10,1 %.

Cette étude a permis de démontrer que l'utilisation du Maxwell® CSC Instrument avec le Maxwell® CSC DNA FFPE Kit pour l'extraction d'ADN était conforme aux exigences d'extraction dans le cadre d'une utilisation avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

12.2 Plage normale et limite

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System est conçu pour mesurer des modifications de longueur des fragments amplifiés. L'étude de plage normale et de limite a été réalisée afin de vérifier la capacité du système à résoudre des amplicons avec des différences by ≥3 paires de bases. Deux ensembles de sept fragments synthétiques d'ADN (« marqueurs de résolution ») ont été analysés au cours de cette étude. Ces fragments se composent d'amplicons marqués par des fluorochromes de taille connue qui sont séparés de 1 bp au sein de chaque ensemble, les deux ensembles devant encadrer les extrémités supérieure (Grand) et inférieure (Petit) de la plage de taille des amplicons des marqueurs MSI (83 à 168 bp).

Les marqueurs de résolution ont été soumis à l'électrophorèse capillaire à l'aide d'un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer et analysé à l'aide du logiciel GeneMapper® 5.0. Les marqueurs de résolution ont été analysés mélangés uniquement avec le Size Standard 500 ou mélangés séparément avec deux échantillons tumoraux MSS et le Size Standard 500. La précision de mesure des différents fragments des marqueurs de résolution a été caractérisée (Tableau 11), et les différences entre tous les fragments séparés par 3 bp ont été calculées et leur moyenne a été déterminée.

Les fragments de résolution ont été mesurés avec précision, avec des écarts-types compris entre 0,07 et 0,13 bp pour les 20 réplicats analysés. Les écarts moyens absolus calculés pour les fragments séparés par 3 bp étaient également précis, compris entre 3,06et 3,40 bp pour les valeurs observées. Ainsi, cette étude a atteint l'objectif de ≥3 paires de bases de résolution et démontré que la précision des mesures des différents marqueurs de résolution (écarts-types ≤0,13 paires de bases) était suffisante pour détecter des différences de taille sur des paires de bases individuelles.

Tableau 11. Statistiques descriptives de la taille des paires de bases des marqueurs de résolution.

Marqueur de résolution	N	Minimum	Maximum	Médiane	Moyenne	Écart-type	CI de 95 %	
							Limite inférieure	Limite supérieure
Large	20	180,60	180,95	180,77	180,75	0,10	180,71	180,80
Large_2	20	181,67	182,02	181,89	181,83	0,10	181,78	181,88
Large_3	20	182,75	182,97	182,85	182,86	0,08	182,83	182,90
Large_4	20	183,70	184,04	183,88	183,85	0,09	183,80	183,89
Large_5	20	184,66	184,99	184,83	184,80	0,09	184,76	184,85
Large_6	20	185,73	186,06	185,90	185,88	0,10	185,83	185,93
Large_7	20	186,80	187,01	186,91	186,91	0,07	186,88	186,94
Small	20	84,29	84,71	84,62	84,57	0,13	84,51	84,63
Small_2	20	85,52	85,95	85,83	85,79	0,13	85,72	85,85
Small_3	20	86,66	87,14	86,95	86,92	0,13	86,86	86,98
Small_4	20	87,71	88,15	87,99	87,97	0,13	87,91	88,03
Small_5	20	88,73	89,18	89,04	89,02	0,12	88,96	89,07
Small_6	20	89,96	90,40	90,25	90,21	0,13	90,15	90,27
Small_7	20	91,06	91,55	91,39	91,34	0,13	91,28	91,41

12.3 Limite du blanc

Une étude de limite du blanc a été réalisée afin de confirmer qu'un blanc (un échantillon MSS dans cette étude) ne produisait pas de résultats MSI-H positifs. Cette étude consistait à tester quatre échantillons MSS connus avec trois lots de kits d'amplification, deux opérateurs et 60 réplicats de chaque échantillon MSS (1 440 résultats de tests au total).

Tous les tests (1 440/1 440 ; 100 %) ont produit des résultats interprétatifs finaux MSS. Les 1 440 résultats de tests représentent 7 200 appels d'allèles de locus mononucléotidique. Pour les locus mononucléotidiques, 99,99 % (7 199/7 200) des qualifications de stabilité des marqueurs étaient stables. Une seule instance d'un locus, NR-21, a été qualifiée d'instable. Un seul locus instable produit un résultat interprétatif final MSS, et cet unique locus instable n'a pas affecté le résultats final du test. En conclusion, l'OncoMate® MSI Dx Analysis System fournit des résultats MSS hautement reproductibles, qui n'ont pas été affectés par le lot ni par l'opérateur.

12.4 Limite de détection

La sensibilité analytique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été déterminée à l'aide d'ADN extrait isolé à partir de six échantillons tumoraux MSI-H et normaux correspondants, ainsi que d'une série de titrages du 2800M Control DNA. Le 2800M Control DNA a été traité comme un échantillon MSS. Les échantillons tumoraux ont été mélangés avec les échantillons normaux correspondants afin de créer un contenu tumoral de 20 % (le contenu tumoral minimum requis). Les échantillons MSI-H et les échantillons MSS ont été testés à 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 et 2,5 ng d'ADN par réaction d'amplification avec 20 réplicats pour chaque échantillon et chaque quantité d'ADN (cinq cas MSI-H × 20 réplicats). Afin d'évaluer l'influence du contenu tumoral sur la limite de détection (LOD), un échantillon tumoral a été associé à l'échantillon normal correspondant pour simuler un contenu tumoral de 5 %, 10 %, 15 % et 20 %.

Quatre réplicats de chaque échantillon d'ADN ont été amplifiés par deux opérateurs avec deux lots de réactifs de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit pendant cinq jours chacun. Comme il n'y eu aucun échec d'après la quantité d'ADN testée, une quantité supplémentaire a été nécessaire pour identifier la limite de détection. Une nouvelle série de dilutions d'échantillons a été préparée afin de réaliser des tests à 0,1 ng par réaction avec des échantillons à 20 % de contenu tumoral, ainsi qu'un échantillon à 2,5 % de contenu tumoral.

Vous trouverez un résumé des résultats interprétatifs des cas MSI-H dans le Tableau 12, des cas MSS dans le Tableau 13 et du contenu tumoral dans le Tableau 14. Le Tableau 15 indique la plus faible concentration d'ADN avec 100 % de résultats positifs pour chaque groupe d'échantillons.

La limite de détection pour l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été déterminée sur deux dimensions : 1) la quantité totale d'ADN d'entrée utilisée pour l'essai et 2) la fraction d'ADN tumorale présente dans l'échantillon. La limite de détection pour l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été établie à 0,5 ng d'ADN d'entrée avec 100 % (200/200) de résultats positifs en utilisant le contenu tumoral minimum de 20 %. Une analyse de lots combinés a indiqué 99,5 % (199/200) de résultats positifs avec 0,2 ng d'ADN. Avec 0,2 ng d'ADN, un résultat de test non valable a été obtenu pour un réplicat sur les vingt réplicats dans ce cas avec un seul lot de réactifs (Tableau 12) en raison d'un signal faible. La limite de détection pour l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été établie à un contenu tumoral de 5 % avec 100 % (40/40) de résultats positifs en utilisant la teneur en ADN recommandée de 1 ng et des échantillons dans lesquels le contenu tumoral a été ajusté en mélangeant avec de l'ADN extrait de tissus normaux correspondants.

Tableau 12. Fréquence des résultats interprétatifs à partir du MSI-H Diluted Sample Set pour l'étude de teneur en ADN, par lot de réactifs.

Lot par teneur en ADN finale (ng)		Résultat interprétatif OncoMate®		Total
		MSI-H	Non valable	
Lot 1	0,1	20	80	100
	0,2	99	1[1]	100
	0,5	100	0	100
	1,0	100	0	100
	2,0	100	0	100
	2,5	100	0	100
Lot 2	0,1	24	76	100
	0,2	100	0	100
	0,5	100	0	100
	1,0	100	0	100
	2,0	100	0	100
	2,5	100	0	100
Tous	0,1	44	156	200
	0,2	199	1	200
	0,5	200	0	200
	1,0	200	0	200
	2,0	200	0	200
	2,5	200	0	200

[1]Un résultat non valable en raison de la faible hauteur de pic de l'allèle détectée.

Tableau 13. Fréquence des résultats interprétatifs à partir du MSS Diluted Sample Set pour l'étude de teneur en ADN, par lot de réactifs.

Lot par teneur en ADN finale (ng)		Résultat interprétatif OncoMate®		Total
		MSS	Non valable	
Lot 1	0,1	0	20	20
	0,2	20	0	20
	0,5	20	0	20
	1,0	20	0	20
	2,0	20	0	20
	2,5	20	0	20
Lot 2	0,1	0	20	20
	0,2	20	0	20
	0,5	20	0	20
	1,0	20	0	20
	2,0	20	0	20
	2,5	20	0	20
Tous	0,1	0	40	40
	0,2	40	0	40
	0,5	40	0	40
	1,0	40	0	40
	2,0	40	0	40
	2,5	40	0	40

Tableau 14. Fréquence des résultats interprétatifs à partir du MSI-H Blended Sample Set pour l'étude de concentration tumorale, par lot de réactifs.

Lot par contenu tumoral (%)		Résultat interprétatif OncoMate®		Total
		MSI-H	MSS	
Lot 1	2,5	0	20	20
	5	20	0	20
	10	20	0	20
	15	20	0	20
	20	20	0	20
Lot 2	2,5	0	20	20
	5	20	0	20
	10	20	0	20
	15	20	0	20
	20	20	0	20
Tous	2,5	0	40	40
	5	40	0	40
	10	40	0	40
	15	40	0	40
	20	40	0	40

Tableau 15. Plus faible teneur en ADN pour 100 % de résultats positifs (Hi = 1.00)[1] pour l'étude de limite de détection de teneur en ADN pour chaque groupe d'échantillons.

Groupe d'échantillons	Ensemble d'échantillons	Plus faible teneur en ADN (ng)	
		Lot 1	Lot 2
CRC-066	MSI-H dilué	0,2	0,2
CRC-079		0,2	0,2
CRC-081		0,2	0,2
CRC-084		0,2	0,2
CRC-213		0,5[2]	0,2
2800M	MSS dilué	0,2	0,2

[1]La limite de détection reposait sur le niveau d'entrée le plus faible permettant d'obtenir 100 % de résultats positifs, Hi = 1,00. « Positif » correspondait à un résultats interprétatif correct.

[2]L'analyse de lots combinés indique 99,5 % (199/200) de résultats positifs pour une 0,2 ng d'ADN (voir Tableau 12).

12.5 Spécificité analytique

La spécificité de la cible des paires d'amorces pour les sept marqueurs de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été contrôlée à l'aide de l'outil de recherche accessible au public Primer BLAST sur le site Web de l'US National Center for Biotechnology Information (**https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/**, consulté le 14/01/2020). Les amorces correspondent à 100 % à l'identité des cibles prévues, et les résultats Primer BLAST prévoyaient une amplification de la cible spécifique.

Une étude de spécificité analytique a permis d'évaluer la spécificité des amorces de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, et a démontré la compatibilité du système avec différents modèles de thermocycleurs.

Les réplicats de 2800M Control DNA ont été traités comme des échantillons MSS. Les échantillons ont été amplifiés avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit avec 1 ng, 2 ng ou 4 ng d'ADN sur chacun des trois modèles de thermocycleurs différents. Les thermocycleurs (Applied Biosystems Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Eppendorf MasterCycler® Nexus SX1 Thermal Cycler et BioRad C1000 Touch™ Thermal Cycler) respectent tous les spécifications de performances requises suivantes :

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

Précision de la température : ±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

La concordance entre les qualifications MSS prévues et observées pour tous les échantillons était de 100 % (36/36). Aucun artefact interférant avec la capacité du système à produire le résultat interprétatif prévu en utilisant différents thermocycleurs n'a été détecté.

12.6 Substances interférentes

Une étude a été réalisée afin de déterminer l'influence potentielle de substances interférentes sur les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, en particulier les sels chaotropiques, l'alcool, la durée de traitement de la protéinase K, les tissus nécrotiques, l'hémoglobine, les triglycérides et la mucine. De l'ADN a été extrait d'échantillons de boucles (tissus de 0,1 à 2 mm^3). Deux extractions d'ADN ont été réalisées pour chaque échantillon dans chaque condition testée avec le Maxwell® CSC Instrument et le Maxwell® CSC DNA FFPE Kit.

Dans la première série d'expériences, les lysats issus de quatre échantillons tumoraux et normaux correspondants ont été traités avec de l'hémoglobine (concentration finale de 2 mg/ml), des triglycérides (concentration finale de 37 mM) ou de la mucine (concentration finale de 1 mg/ml) avant l'extraction de l'ADN. Suite à l'analyse avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, tous les échantillons ont produit le résultat prévu.

Quatre échantillons tumoraux et normaux correspondants (deux réplicats par échantillon pour un total de 16 extractions) ont été mis à incuber à 56 °C en présence de protéinase K pendant 20 minutes, 30 minutes (condition recommandée) ou 40 minutes avant la purification. Tous les échantillons ont produit le résultat prévu.

Douze échantillons tumoraux avec des tissus nécrotiques allant de 0 % à environ 75 % et des échantillons normaux correspondants ont été testés. Tous les échantillons ont produit le résultat prévu.

Promega

Afin d'évaluer l'impact d'éventuels résidus d'alcool ou de sels de guanidine du processus de purification de l'ADN, des aliquots de l'ADN extrait des échantillons tumoraux et normaux correspondants avec différentes teneurs en tissus nécrotiques (de 0 % à environ 75 %) ont été traités avec de l'éthanol (concentration finale de 5 %), de l'hydrochlorure de guanidine (concentration finale de 50 µM) ou de l'eau avant l'amplification et l'analyse. Tous les échantillons ont produit le résultat prévu.

En conclusion, l'OncoMate® MSI Dx Analysis System n'a présenté aucun impact statistiquement significatif sur les performances de l'essai dû à des substances interférentes, en particulier les sels chaotropiques (hydrochlorure de guanidine à 50 µM), l'éthanol (5 %), les tissus nécrotiques (0 à 75 %), l'hémoglobine (2 mg/ml), les triglycérides (37 mM) et la mucine (1 mg/ml) ou la durée de digestion de la protéinase K [20, 30 (standard) ou 40 minutes] testées dans cette étude (Tableau 16).

Tableau 16. Traitement des échantillons avec l'OncoMate® MSI Dx Analysis System par résultat interprétatif.

	Résultat interprétatif[1]				Total	
	MSI-H		MSS			
Traitement des échantillons	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
20 minutes à 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
30 minutes à 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
40 minutes à 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
Traitement à l'éthanol	8	50,0	8	50,0	16	100
Traitement à la guanidine	8	50,0	8	50,0	16	100
Hémoglobine	4	50,0	4	50,0	8	100
Mucine	4	50,0	4	50,0	8	100
Nécrose	14	58,3	10	41,7	24	100
Triglycérides	4	50,0	4	50,0	8	100
Traitement à l'eau	8	50,0	8	50,0	16	100
Total	62	51,7	58	48,3	120	100

[1]Tous les échantillons ont produit le résultat prévu (MSS ou MSI-H) lors des expériences sur les substances interférentes.

12.7 Contamination croisée

La contamination croisée entre échantillons dans l'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été évaluée à l'aide d'ADN extrait d'un échantillon MSI-H et d'un échantillon MSS, incluant chacun l'échantillon tumoral et l'échantillon normal correspondant. Les échantillons et les blancs de réactifs ont été placés en alternance sur des plaques à 96 puits. Cette disposition sur les plaques a été utilisée pour réaliser l'amplification, l'électrophorèse capillaire et l'analyse chaque jour pendant 10 jours. Les résultats prévus incluaient des résultats de tests non valables, MSI-H et MSS. Le résultat de test non valable était prévu pour les blancs de réactifs. La moyenne des résultats n'a pas été calculée, et tout résidu observé a été signalé.

La concordance était de 100 % entre le résultat interprétatif observé et les résultats attendus pour les 470 échantillons analysés, et aucune interférence avec l'interprétation des données n'a été observée. Cette étude a permis de conclure que l'OncoMate® MSI Dx Analysis System n'était pas susceptible de provoquer une contamination croisée entre échantillons.

12.8 Reproductibilité

La précision et la reproductibilité pour l'OncoMate® MSI Dx Analysis System ont été évaluées sur plusieurs sites, opérateurs, cycles, jours, réplicats et lots de kits d'essai. La répétabilité et la précision des données ont été évaluées entre différents sites, entre différents opérateurs, entre différents cycles, entre différents jours, au sein d'un même cycle et entre différents lots.

Le panel de test comportait sept échantillons CRC (quatre cas MSI-H et trois cas MSS), un témoin d'amplification négatif (Water, Amplification Grade) et un témoin d'amplification positif (2800M Control DNA). Deux des échantillons MSI-H ont été ajustés à une charge tumorale de 20 % (le contenu tumoral minimum) en mélangeant de l'ADN extrait de l'échantillon tumoral avec de l'ADN normal correspondant. Les échantillons ont été distribués aux opérateurs en aveugle sur chacun des sites de test. Le panel d'échantillons a été testé par deux opérateurs installés dans chacun des trois sites sur trois appareils (un sur chaque site). Les trois sites utilisés pour les tests étaient deux sites externes et un site interne. Deux réplicats par échantillon ont été testés, avec trois lots de réactifs, deux cycles par jour, trois jours non consécutifs.

Les fréquences absolues et relatives ont été calculées pour le résultat interprétatif par site, opérateur, jour, lot et réplicat, et les données sont fournies dans le Tableau 17.

Les pourcentages de concordance positifs (PPA) pour les résultats interprétatifs MSI-H et les pourcentages de concordance négatifs (NPA) pour les résultats interprétatifs MSS versus les résultats attendus (Tableau 18) étaient reproductibles pour le site, l'opérateur, le jour, le lot, le cycle et le réplicat. Les PPA pour le site, l'opérateur, le jour, le lot, le cycle et le réplicat étaient compris entre 95,2 et 100 %, et les NPA étaient tous de 100 %, ce qui démontre la reproductibilité pour chaque facteur testé. La reproductibilité globale pour PPA (CI de 95 %) et NPA (CI de 95 %) était respectivement de 98,6 % (96,4 à 99,6 %) et de 100 % (98,3 à 100 %).

Tous les échantillons étaient 100 % concordants et reproductibles avec des résultats attendus pour les différents facteurs à l'exception d'un échantillon MSI-H pour lequel la concordance était de 93,8 % (60/64). Cet échantillon avec un contenu tumoral au niveau minimum requis de 20 %. Huit des 72 résultats attendus pour cet échantillon n'ont pas été inclus dans l'analyse, car ils n'ont pas fourni un résultat valide en raison d'un signal faible.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer la reproductibilité de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et des réactifs entre sites, opérateurs, jours, lots, cycles et réplicats.

Promega

Tableau 17. Fréquences absolues et relatives pour le résultat interprétatif par site, opérateur, jour, cycle, lot et réplicat.

		Résultat de référence													
		MSI-H						MSS							
Résultat interprétatif		MSI-H		MSS		Total		MSI-H		MSS		Total		Nombre total de résultats analysés	Nombre total de résultats attendus
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	N
Site	1	96	100	0	0	96	100	0	0	70	100	70	100	166	168
	2	86	97,7	2	2,3	88	100	0	0	72	100	72	100	160	168
	3	94	97,9	2	2,1	96	100	0	0	72	100	72	100	168	168
Opérateur	1	48	100	0	0	48	100	0	0	36	100	36	100	84	84
	2	48	100	0	0	48	100	0	0	34	100	34	100	82	84
	3	40	95,2	2	4,8	42	100	0	0	36	100	36	100	78	84
	4	46	100	0	0	46	100	0	0	36	100	36	100	82	84
	5	48	100	0	0	48	100	0	0	36	100	36	100	84	84
	6	46	95,8	2	4,2	48	100	0	0	36	100	36	100	84	84
Jour	1	90	95,7	4	4,3	94	100	0	0	70	100	70	100	164	168
	2	92	100	0	0	92	100	0	0	72	100	72	100	164	168
	3	94	100	0	0	94	100	0	0	72	100	72	100	166	168
Lot	1	94	97,9	2	2,1	95	100	0	0	72	100	72	100	168	168
	2	92	97,9	2	2,1	95	100	0	0	70	100	70	100	164	168
	3	90	100	0	0	90	100	0	0	72	100	72	100	162	168
Répétition	1	138	98,6	2	1,4	140	100	0	0	107	100	107	100	247	252
	2	138	98,6	2	1,4	140	100	0	0	107	100	107	100	247	252
Total		276	98,6	4	1,4	280	100	0	0	214	100	214	100	494	504

Tableau 18. Résumé des PPA et NPA pour le résultat interprétatif vs. résultat de référence.

Résultat interprétatif		PPA MSI-H observé/prévu		NPA MSS observé/prévu	
		% (#/n)	CI de 95 %	% (#/n)	CI de 95 %
Site	1	100 % (96/96)	[96,2 ; 100]	100 % (70/70)	[94,9 ; 100]
	2	97,7 % (86/88)	[92,0 ; 99,7]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
	3	97,9 % (94/96)	[92,7 ; 99,7]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
Opérateur	1	100 % (48/48)	[92,6 ; 100]	100 % (36/36)	[90,3 ; 100]
	2	100 % (48/48)	[92,6 ; 100]	100 % (34/34)	[89,7 ; 100]
	3	95,2 % (40/42)	[83,8 ; 99,4]	100 % (36/36)	[90,3 ; 100]
	4	100 % (46/46)	[92,3 ; 100]	100 % (36/36)	[90,3 ; 100]
	5	100 % (48/48)	[92,6 ; 100]	100 % (36/36)	[90,3 ; 100]
	6	95,8 % (46/48)	[85,7 ; 99,5]	100 % (36/36)	[90,3 ; 100]
Jour	1	95,7 % (90/94)	[89,5 ; 98,8]	100 % (70/70)	[94,9 ; 100]
	2	100 % (92/92)	[96,1 ; 100]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
	3	100 % (94/94)	[96,2 ; 100]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
Lot	1	97,9 % (94/96)	[92,7 ; 99,7]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
	2	97,9 % (92/94)	[92,5 ; 99,7]	100 % (70/70)	[94,9 ; 100]
	3	100 % (90/90)	[96,0 ; 100]	100 % (72/72)	[95,0 ; 100]
Cycle	A	98,6 % (138/140)	[94,9 ; 99,8]	100 % (108/108)	[96,6 ; 100]
	B	98,6 % (138/140)	[94,9 ; 99,8]	100 % (106/106)	[96,6 ; 100]
Répétition	1	98,6 % (138/140)	[94,9 ; 99,8]	100 % (107/107)	[96,6 ; 100]
	2	98,6 % (138/140)	[94,9 ; 99,8]	100 % (107/107)	[96,6 ; 100]
Total		98,6 % (276/280)	[96,4 ; 99,6]	100 % (214/214)	[98,3 ; 100]

12.9 Évaluation de la concordance entre les méthodes d'analyse des données

Une étude de concordance a été réalisée afin de comparer la méthode d'analyse des données MSI décrite dans le *Manuel technique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System* #TM595 à utiliser en Europe avec le logiciel dédié aux études analytiques et cliniques de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System.

L'OncoMate® MSI Dx Analysis System a été utilisé pour réaliser des essais sur des échantillons d'ADN tumoraux et normaux correspondants issus de 84 cas de CRC. Les fichiers de données brutes générés à l'aide d'un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer ont été analysés et interprétés afin de déterminer leur statut MSI avec les deux méthodes d'analyse suivant les procédures décrites dans les instructions correspondantes. Ces résultats ont permis une évaluation quantitative de la concordance interprétative entre les méthodes en calculant le pourcentage de concordance positif (PPA), le pourcentage de concordance négatif (NPA) et le pourcentage de concordance global (OPA). Un critère d'acceptation d'OPA ≥ 95 % a été utilisé.

Il a été démontré que les deux méthodes d'analyse des données été équivalente, avec un pourcentage de concordance global de 100 %. Les résultats interprétatifs MSI générés suivant les instructions décrites dans le *Manuel technique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System* #TM595 sont équivalents aux résultats générés à l'aide du logiciel de distribution limitée utilisé pour les études analytiques et cliniques. Les Tableaux 19 et 20 résument les résultats de concordance. Ces résultats ont été générés à l'aide de la méthode d'analyse décrite dans le *Manuel technique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System* #TM595, pas du logiciel de distribution limitée utilisé pour les études analytiques et cliniques.

Tableau 19. Évaluation de la concordance entre les résultats MSI.

		Logiciel interprétatif de distribution limitée			
		MSI-H	**MSS**	**Non valable**	**Total**
GeneMapper® 5.0*	**MSI-H**	43	0	0	43
	MSS	0	41	0	41
	Non valable	0	0	0	0
	Total	43	41	0	

Analyse des données réalisée comme indiqué dans le *Manuel technique de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System #TM595

Tableau 20. Évaluation de la concordance entre les résultats MSI à l'aide de GeneMapper® 5.0 ou du logiciel de distribution limitée.

	Estimation	Limite inférieure ≥95 % CI	Limite supérieure ≥95 % CI
PPA	100 %	91,8 %	100 %
NPA	100 %	91,4 %	100 %
OPA	100 %	95,6 %	100 %

Pourcentage de concordance positif (PPA), pourcentage de concordance négatif (NPA) et pourcentage de concordance global (OPA).

13. Performances cliniques

Le principal objectif de l'évaluation des performances cliniques était de démontrer les performances de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System pour identifier l'instabilité des microsatellites en milieu clinique par rapport à une autre méthode de pointe. Une comparaison des méthodes a été réalisée entre l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et le VENTANA™ MMR IHC Panel, qui indique la présence ou l'absence de protéines de réparation des mésappariements d'ADN.

Cette étude a été effectuée en testant une série séquentielle d'échantillons provenant de patients atteints de cancer colorectal qui ont été complétés par un deuxième ensemble d'échantillons de patients avec suspicion de syndrome de Lynch, pour un total de 146 cas. Des échantillons d'ADN tumoraux et normaux correspondants issus de 146 cas de cancer colorectal (CRC) de statut MSI inconnu ont été randomisés puis analysés par l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Des échantillons de boucles, générés à partir de blocs de tissus FFPE, ont été fournis à un laboratoire externe afin de réaliser une immunohistochimie. L'immunohistochimie a été réalisée sur les 146 échantillons tumoraux afin de déterminer l'expression protéique des gènes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 et BRAF à l'aide du VENTANA™ MMR IHC Panel sur les échantillons de boucles fournis, conformément au mode d'emploi du VENTANA™ et aux procédures standard du laboratoire.

13.1 Résultats de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System vs. IHC

Les résultats de la comparaison entre l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et le VENTANA IHC MMR Panel pour les 146 échantillons sont fournis dans le Tableau 17. Au total, 106 échantillons ont été déterminés comme MSS à l'aide de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et comme MMR Intact pour les quatre protéines MMR à l'aide du VENTANA IHC MMR Panel. Trente-sept échantillons présentaient une perte de coloration IHC pour au moins l'une des quatre protéines MMR (dMMR). Parmi ces 37 échantillons, 36 échantillons ont été déterminés comme MSI-H par l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Vingt-trois échantillons ont été déterminés comme susceptibles de porter le syndrome de Lynch d'après IHC (loss of MMR protein expression and wildtype BRAF) et MSI-H par l'OncoMate® MSI Dx Analysis System. Treize échantillons ont été déterminés comme MSI-H par l'OncoMate® MSI Dx Analysis System et présentaient une perte d'expression des protéines MLH1 et PMS2. Ces échantillons présentaient une mutation BRAF V600E, cohérente avec une mutation sporadique. Un échantillon était MSS mais présentait une perte des deux gènes MLH1 et PMS2 sans aucun signe de mutation BRAF V600E.

Trois échantillons ont été déterminés comme MSI-H par l'OncoMate® MSI Dx Analysis System, mais déterminés comme présentant une coloration IHC intacte pour les quatre protéines MMR. Un statut IHC MMR intact et MSI-H a été signalé dans la littérature à un taux de 5 à 10 % (16). Il semble que cela puisse être attribué à une protéine MMR dysfonctionnelle qui retient encore les sites de liaison aux épitopes (qui maintient une réactivité croisée avec l'anticorps). Les résultats d'étude recueillis ici sont en accord avec les résultats décrits dans la littérature (16). Les données sont résumées dans les Tableaux 21 et 22.

Le pourcentage de concordance positif (PPA) était de 97,3 % et le pourcentage de concordance négatif (NPA) était de 97,2 % avec un pourcentage de concordance global (OPA) entre les deux méthodes de 97,3 %. L'OncoMate® MSI Dx Analysis System a identifié efficacement les tumeurs avec déficience MMR, et présente une forte concordance avec le VENTANA MMR IHC Panel.

Tableau 21. Comparaison des résultats interprétatifs de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System vs. IHC (MMR : perte/intact).

OncoMate® MSI Dx Analysis System	IHC				Total	
	Perte de MMR		MMR intact			
	N	%	N	%	N	%
MSI-H	36	97,3	3	2,8	39	26,7
MSS	1	2,7	106	97,2	107	73,3
Total	37	100	109	100	146	100

Tableau 22. Comparaison des résultats interprétatifs de l'OncoMate® MSI Dx Analysis System vs. IHC (MMR : perte/intact) : Mesures de concordance.

OncoMate® MSI Dx Analysis System vs. IHC	Estimation	Valeur inférieure 95 % CI	Valeur supérieure 95 % CI
PPA	97,3	86,2	99,5
NPA	97,2	92,2	99,1
OPA	97,3	93,2	98,9

14. Récapitulatif des modifications

1. Mise à jour pour la conformité IVDR.
2. Remplacement du symbole de marque par le symbole de marque déposée pour OncoMate.
3. Modification de la Section 10, Bibliographie.
4. Mise à jour du symbole de Représentant agréé.
5. Remplacement de l'image de couverture et mise à jour de la police du document.

Promega

Date de révision TM595 : 7/26

Version : Rev2

[a]Numéros de brevets aux États-Unis 7 749 706 et 7 902 343.

[b]Numéro de brevet aux États-Unis 9 139 868, numéro de brevet européen 2972229, et autres brevets en attente.

[c]Les fluorochromes TMR-ET, CXR-ET et WEN sont exclusifs.

©2019–2026 Promega Corporation. Tous droits réservés.

GoTaq, Maxwell, OncoMate et QuantiFluor sont des marques déposées de Promega Corporation.

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

Les produits peuvent être couverts par des brevets publiés ou en attente d'approbation ou peuvent présenter certaines limites. Veuillez consulter notre site Web pour plus d'informations. Tous les prix et spécifications peuvent être modifiés sans préavis.

Les allégations concernant les produits peuvent être modifiées. Veuillez contacter Promega Technical Services ou accéder au catalogue en ligne de Promega pour bénéficier des informations les plus récentes sur les produits Promega.