

TECHNISCHES HANDBUCH

OncoMate® MSI Dx Analysis System

Gebrauchsanweisung für das Produkt
MD3140



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Deutschland

CE 2797

GEBRAUCHS-
AN-
WEISUNG FÜR
DAS PRODUKT
MD3140



OncoMate® MSI Dx Analysis System

1. Einführung.....	3
1.1 Übersicht über das OncoMate® MSI Dx Analysis System	3
1.2 Produktname.....	4
1.3 Abkürzungen und Definitionen	5
1.4 Legende zu den verwendeten Symbolen.....	6
1.5 Verwendungszweck.....	7
1.6 Hintergrundinformationen	8
1.7 Testprinzip.....	9
2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen	12
2.1 Materialien, die mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System (Cat.# MD3140) geliefert werden	12
2.2 Lagerung und Handhabung des OncoMate® MSI Dx Analysis System	13
2.3 Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien.....	13
3. Bevor Sie beginnen	14
3.1 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	14
3.2 Probenanforderungen	15
3.3 DNA-Extraktionsmethoden und DNA-Qualitätsanforderungen	15
3.4 DNA-Quantitätsanforderungen	15
3.5 Anforderungen an den Thermocycler	16
3.6 Anforderungen an das Kapillarelektrophorese-Gerät	16
3.7 Anforderungen an die Spektralkalibrierung des Kapillarelektrophorese-Geräts.....	17
3.8 Anforderungen an die Datenanalyse-Software.....	17
3.9 Anforderungen an analytische Schwellenwerte	17
4. Assay-Protokoll.....	18
4.1 Verdünnung von FFPE-Gewebe-DNA-Extrakten	18
4.2 2800M Control DNA-Verdünnung	19
4.3 Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System	20
4.4 Thermocycling.....	22
4.5 Vorbereitung des Kapillarelektrophorese-Geräts	22
4.6 Vorbereitung der vom OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifizierten Fragmente zur Kapillarelektrophorese.....	23
4.7 Nachweis von amplifizierten Fragmenten durch Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion.....	24
5. Datenanalyse	24
5.1 Einführung	24
5.2 Analysieren von Daten	26

6. Überprüfung und Interpretation der Ergebnisse	28
6.1 Die OncoMate® MSI Dx Analysis System-Daten kennen	29
6.2 Übersicht über die bekannten Amplifikationsfehler und Anomalien bei der Kapillarelektrophorese	31
6.3 Anforderungen an die Qualitätskontrolle für die Dateninterpretation	32
6.4 Bestimmung der Stabilität von Mononukleotid-Repeat-Markern	43
6.5 Auswertung des MSI-Status des Tumors	45
7. Assay-Qualitätskontrollen	50
7.1 Spektrale Kalibrierung	50
7.2 Übereinstimmende normale Gewebeprobe	50
7.3 Positiv- und Negativkontrollen	50
7.4 Kapillarelektrophorese-Standards	51
7.5 Analytischer Schwellenwert	51
8. Spezifische Einschränkungen	52
9. Fehlerbehebung	53
10. Literaturangabe	60
11. Weitere Informationen	61
11.1 Anhang A	61
11.2 Anhang B	62
11.3 Anhang C	66
12. Analytische Leistung	70
12.1 DNA-Extraktion	70
12.2 Normalbereich und Grenzwerte	70
12.3 Erfassungsgrenze	72
12.4 Nachweisgrenze	72
12.5 Analytische Spezifität	77
12.6 Störsubstanzen	77
12.7 Kreuzkontamination	79
12.8 Reproduzierbarkeit	79
12.9 Bewertung der Konkordanz zwischen Datenanalysemethoden	82
13. Klinische Leistung	83
13.1 Ergebnisse des OncoMate® MSI Dx Analysis System im Vergleich zu IHC-Ergebnissen	83
14. Änderungsübersicht	85

TM595 Revisionsdatum: 07.26

Version: Rev2

1. Einführung

1.1 Übersicht über das OncoMate® MSI Dx Analysis System

Diese Anleitung beschreibt das OncoMate® MSI Dx Analysis System^(a-c) und ist die primäre Quelle für Informationen über den Verwendungszweck, Komponenten, Beschränkungen, Protokoll, Fehlerbehebung und mehr. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist ein CE-gekennzeichnetes IVD-Medizinprodukt, das im Rahmen eines umfassenderen Labor-Workflows verwendet wird, um mithilfe eines Fluoreszenz-PCR-basierten Assays (Abbildung 1) Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeprobe auf Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) zu analysieren. Der OncoMate® 5C Matrix Standard (Cat.# MD3850) ist zur Kapillarelektrophorese-Analyse der vom OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifizierten Produkte erforderlich. Anleitungen zur Verwendung des OncoMate® 5C Matrix Standard finden Sie im *Technischen Handbuch zum OncoMate® 5C Matrix Standard* Nr. TM597.

Der komplette Workflow rund um den Einsatz des OncoMate® MSI Dx Analysis System umfasst die DNA-Extraktion aus FFPE-Gewebeprobe, die Quantifizierung der DNA, die Amplifikation spezifischer Mikrosatelliten-Marker mittels Multiplex-PCR, die Analyse amplifizierter DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese und die Analyse von Daten zu Kapillarelektrophorese-Fragmenten mittels einer Fragmentanalyse-Software. Die Benutzer des OncoMate® MSI Dx Analysis System müssen geeignete Workflow-Komponenten auf Grundlage der in Abschnitt 3 genannten Anforderungen auswählen. Weitere Informationen finden Sie in der technischen Literatur zu dem ausgewählten DNA-Extraktionsverfahren, der DNA-Quantifizierungsmethode, dem Thermocycler, dem Kapillarelektrophorese-Gerät und der Fragmentanalyse-Software.



DNA isolieren.



DNA quantifizieren.

Reagenzien zur Quantifizierung von DNA mittels Fluoreszenz, Geräte oder beides (siehe Abschnitt 1.7)



DNA amplifizieren.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System (Cat. # MD3140, TM595)
Thermocycler, bei dem ein Ramping von 3,9–5 °C/Sekunde möglich ist



Farbspektrum kalibrieren.

OncoMate™ 5C Matrix Standards (Cat. # MD3850, TM597)



Trennen und nachweisen.

Applied Biosystem® 3500 Dx Genetic Analyzer
oder ein vergleichbares Kapillarelektrophorese-Gerät



Daten analysieren und interpretieren.

Fragmentanalyse-Software

15207TB

Abbildung 1. Labor-Workflow im Zusammenhang mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System.

1.2 Produktname

OncoMate® MSI Dx Analysis System

Cat. # MD3140, 100 Reaktionen



1.3 Abkürzungen und Definitionen

bp, base pair (Basenpaar)

CRC, colorectal cancer (Kolonkarzinom)

DCS, data collection software (Datenerfassungssoftware)

dMMR, deficient-mismatch-repair (Mismatch-Repair-Defizienz)

dsDNA, double-stranded DNA (Doppelstrang-DNA)

ESMO, European Society for Medical Oncology

FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded (Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet)

HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom)

ICI, immune checkpoint inhibitor (Immun-Checkpoint-Inhibitor)

LOH, loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)

MMR, mismatch repair (Fehlpaarungsreparatur)

MSI, microsatellite instability (Mikrosatelliten-Instabilität)

MSI-H, microsatellite instability high (Mikrosatelliten-Instabilität hoch): Probeninterpretationsergebnis, wenn zwei oder mehr Marker instabil sind

MSS, microsatellite stable (mikrosatellitenstabil): Probeninterpretationsergebnis, wenn weniger als zwei Marker instabil sind

PCR, polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

RFU, relative fluorescence units (relative Fluoreszenzeinheiten)

QC, Qualitätskontrolle

NA, Nicht anwendbar

Allel: eine von zwei oder mehreren Formen (z. B. Länge) eines DNA-Markers

Bleed-through: Kapillarelektrophorese-Artefakt, bei dem Peaks aus einem Farbkanal in einem zweiten Farbkanal mit etwa gleicher Größe (bp) nachgewiesen werden; auch bekannt als „spektrales Pull-up“

DNA-Marker: eine interessierende Sequenz innerhalb eines Genoms

Heterozygot: die Allele für einen DNA-Marker haben unterschiedliche Formen

Homozygot: die Allele für einen DNA-Marker haben die gleiche Form

Mononukleotid-Repeat: DNA-Struktur, bei der die gleiche Nukleotidbase wiederholt wird

Quasi-monomorph: ein DNA-Marker, für den die meisten Individuen homozygot für das gleiche gemeinsame Allel sind

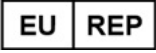
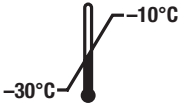
Stabil: es ist keine Allelgrößenänderung vorhanden, die auf eine Mismatch-Repair-Defizienz hinweist

1.3 Abkürzungen und Definitionen (Fortsetzung)

Stutter-Peak: ein PCR-Artefakt, das durch das Verrutschen der Polymerase während der in-vitro-DNA-Replikation entsteht. Stutter-Peaks sind um eine oder mehrere Repeat-Einheiten kürzer oder länger als der tatsächliche Allelpeak

Instabil: es ist eine Allelgrößenänderung vorhanden, die auf eine Mismatch-Repair-Defizienz hinweist

1.4 Legende zu den verwendeten Symbolen

Symbol	Erklärung	Symbol	Erklärung
	In-vitro-Diagnostikum		Bevollmächtigter
	Bei -30 °C bis -10 °C aufbewahren		Hersteller
	Europäische Konformität		Reizend
	Katalognummer		Chargennummer
	Nicht zur Wiederverwendung		Ausreichend für <n> Tests
	Verwendbar bis		Vor Lichteinstrahlung schützen
	Gebrauchsanweisung lesen		

1.5 Verwendungszweck

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist ein nicht automatisierter, qualitativer PCR-basierter Fragmentgrößentest zur Bestimmung des MSI-Status (Mikrosatelliten-Instabilität) in DNA, die aus humanen Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE-)Gewebeproben aus soliden Tumoren von Patienten, bei denen bereits ein kolorektales Karzinom diagnostiziert wurde, aufgereinigt wurde. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System wird als Hilfsmittel bei der Diagnose von Patienten mit Lynch-Syndrom verwendet, einem hereditären Krebsyndrom. Es dient dabei zur Identifizierung von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit MSI-High-Tumoren, die möglicherweise von zusätzlichen Keimbahnuntersuchungen profitieren könnten. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist nicht zur Verwendung als Hilfsmittel bei der Auswahl von Medikamenten für Krebspatienten vorgesehen.

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System erzeugt Allelprofile aus Tumor- und normalen (Nicht-Tumor-)FFPE-Gewebeproben desselben Patienten mit einer Amplifikation von 5 Mononukleotid-DNA-Mikrosatellitmarkern (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und MONO-27) durch Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Anschließend erfolgt eine Größentrennung der amplifizierten Marker mittels Fluoreszenzdetektion auf einem Kapillarelektrophorese-Gerät. Durch den Vergleich der Allelprofile wird der MSI-Status bestimmt. Eine Veränderung der Länge von repetitiven DNA-Sequenzen in der Tumorzell-DNA im Vergleich zur normalen Zell-DNA desselben Patienten deutet auf eine MSI hin. Normales und Tumorgewebe desselben Patienten müssen gleichzeitig getestet werden und die Daten beider Proben müssen zum Vergleich verfügbar sein, damit die Ergebnisse gültig sind.

Die mit dem Produkt ermittelten Testergebnisse müssen von medizinischem Fachpersonal zusammen mit anderen klinischen Befunden, der Familienanamnese und Labordaten interpretiert werden. Dieses Produkt ist ausschließlich zur Verwendung durch Fachpersonal bestimmt.

1.6 Hintergrundinformationen

Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen, die aus Repeat-Einheiten von einem bis sechs Nukleotiden bestehen [z. B. (A)_n, (CA)_n, (AAAAG)_n]. Mikrosatelliten-Sequenzen sind im gesamten menschlichen Genom verteilt und neigen zu Einfüge- und Verlustfehlern während der DNA-Replikation. Normalerweise werden Fehler durch das zelluläre DNA-Mismatch-Repair-(MMR)-System repariert. Eine MSI wird beobachtet, wenn die MMR-Funktion unzureichend ist und DNA-Replikationsfehler nicht behoben werden, was zu unterschiedlichen Längen von Mikrosatelliten-Allelen in MMR-defizientem Gewebe im Vergleich zu normalen Gewebeproben führt (Bacher, 2004; Boland, 2010; Ionov, 1993; Umar, 2004; Wang, 2017). Bei den Mikrosatelliten treten Instabilitäten am häufigsten bei den Mononukleotid-Repeats auf (Bacher, 2004; Ionov, 1993). Die Mikrosatelliten-Instabilität kann auf mehrere zugrunde liegende Mechanismen zurückzuführen sein, darunter somatische und Keimbahnmutation von MMR-Genen und Veränderungen in MMR-Gen-Promotorregionen. Bei Individuen mit MMR-Defekten kann die Anhäufung von Mutationen zu zellulären Dysfunktionen und schließlich zu Karzinomen führen (Boland, 2010; Le, 2015; Timmermann, 2010).

Die Mikrosatelliten-Instabilität steht in hohem Maße in Korrelation mit dem Lynch-Syndrom. Das Lynch-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die sich aus Keimbahnmutationen in einem der vier wichtigsten MMR-Gene (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) ergibt und eine Prädisposition für Karzinome darstellt. Die Identifizierung des Lynch-Syndroms ermöglicht eine frühzeitige Krebserkennung und Intervention an einem Punkt der Erkrankung, an dem das Überleben leichter beeinflusst werden kann. Der Mikrosatelliten-Instabilitätstest kann nicht zur Diagnose des Lynch-Syndroms herangezogen werden. Stattdessen stellt der MSI-Test eine schnelle und kostengünstige Methode zur Erkennung einer MMR-Defizienz in CRC-Tumorzellen dar. Auf Genomebene führt ein Ausfall eines MMR-Gens zu einem Verlust der Expression oder Funktion des entsprechenden MMR-Proteins. Die Mikrosatelliten-Instabilität resultiert aus einer MMR-Defizienz und gibt daher neben der klinischen und familiären Anamnese Auskunft über eine zugrunde liegende genetische Suszeptibilität. Häufige mit dem Lynch-Syndrom assoziierte Karzinome sind kolorektale Karzinome; das Lynch-Syndrom wurde jedoch bei praktisch allen soliden Tumorarten nachgewiesen (Cortes-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018). Mehrere klinische Onkologieverbände empfehlen universelle MMR- oder MSI-Tests bei Patienten mit einer Vorgeschichte von Kolon- oder Rektumkarzinom, um Kandidaten für weitere Gentests auf das Lynch-Syndrom zu identifizieren, darunter die European Society for Medical Oncology (ESMO; Stjepanovic, 2019) und die American Society of Clinical Oncology (Sepulveda, 2017; Stoffel, 2015).

1.7 Testprinzip

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist ein Fluoreszenz-Multiplex-PCR-basierter Test zur Identifizierung von Längenänderungen der DNA-Sequenz in Mikrosatelliten-Regionen der Tumorzell-DNA im Vergleich zu denselben Regionen in normalen Zellen des Patienten. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System untersucht sieben Mikrosatellitenmarker: fünf Mononukleotid-Repeat-Marker (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und MONO-27) und zwei Pentanukleotid-Repeat-Marker (Penta C und Penta D; Tabelle 1, Abbildung 2). Diese Mononukleotid-Repeat-Marker werden analysiert, um den MSI-Status zu bestimmen, und wurden aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität gegenüber Änderungen der Repeat-Längen in Proben mit Mismatch-Repair-Defizienz ausgewählt. Für jeden der fünf Mononukleotid-Repeat-Marker werden die Allelgrößen (in Basenpaar, bp) in der Tumorprobe mit denen in der Normalgewebe-Probe verglichen, um zu bestimmen, ob ein neues Allel, das eine MSI aufweist, vorhanden ist (Abbildung 3). Ein Marker wird als instabil interpretiert, wenn ein neues Allel erkannt wird, das eine Größendifferenz von mindestens 2,75 bp (3 Basen minus 0,25 Basenpaar zur Erfüllung der Größengenauigkeit bei der Kapillarelektrophorese) im Vergleich zum Referenzallel in der Normalgewebe-Probe aufweist. Eine Tumorprobe gilt als MSI-H, wenn zwei oder mehr Marker als instabil interpretiert werden. Eine Tumorprobe gilt als MSS, wenn weniger als zwei Marker als instabil interpretiert werden (Hampel, 2008; Boland, 1998). Obwohl diese Marker quasi-monomorph sind (d. h. die meisten Individuen sind für die gleichen gemeinsamen Allele homozygot) und normales Gewebe typischerweise nur eine Peakansammlung an jedem Mononukleotid-Marker aufweist, wurde zwischen Individuen eine niederfrequente Heterozygotie oder Variation der Länge der Normalgewebe-Allele beobachtet. Aufgrund der Möglichkeit der Heterozygotie müssen Daten aus gepaarten Normalgewebe- und CRC-Tumorproben gemeinsam interpretiert werden, um den Tumor-MSI-Status zu bestimmen. Zur Identitätsbestätigung zwischen der Normalgewebe- und der Tumor-DNA-Probe werden zwei Pentanukleotid-Repeat-Marker analysiert. Diese wurden aufgrund ihres hohen Polymorphismus und ihres niedrigeren MSI-Grades ausgewählt (Bacher, 2004). Wenn alle in der Normalgewebe-Probe nachgewiesenen Allele auch in der Tumorprobe vorhanden sind, ist die Probenidentität bestätigt.

Tabelle 1. Erwartete Größenbereiche der Amplifikation und Detektionskanäle für die im OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit enthaltenen Marker. Die Bereiche entsprechen den erwarteten Größen für Daten, die mit dem POP-7® Polymer und einem 50-cm-Kapillar-Array generiert wurden.

Mononukleotid-Marker	Repeat-Struktur	Detektionskanal	Größenbereich Amplifikation
BAT-26	A ₍₂₆₎	Blau	83 bis 121 bp
NR-21	A ₍₂₁₎	Grün	83 bis 108 bp
BAT-25	A ₍₂₅₎	Grün	110 bis 132 bp
MONO-27	A ₍₂₇₎	Grün	134 bis 168 bp
NR-24	A ₍₂₄₎	Gelb (schwarz angezeigt)	103 bis 138 bp
Pentanukleotid-Marker	Repeat-Struktur	Detektionskanal	Größenbereich Amplifikation
Penta D	AAAGA ₍₂₋₁₇₎	Blau	123 bis 253 bp
Penta C	AAAAC ₍₄₋₁₇₎	Gelb (schwarz angezeigt)	140 bis 228 bp

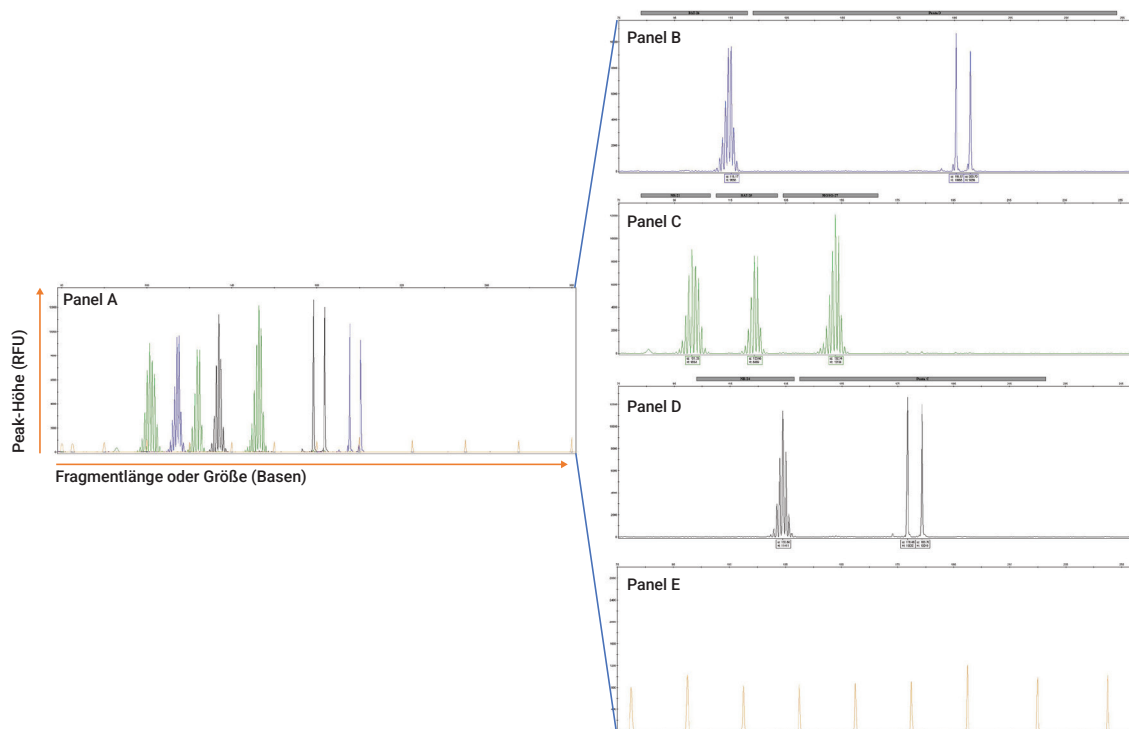
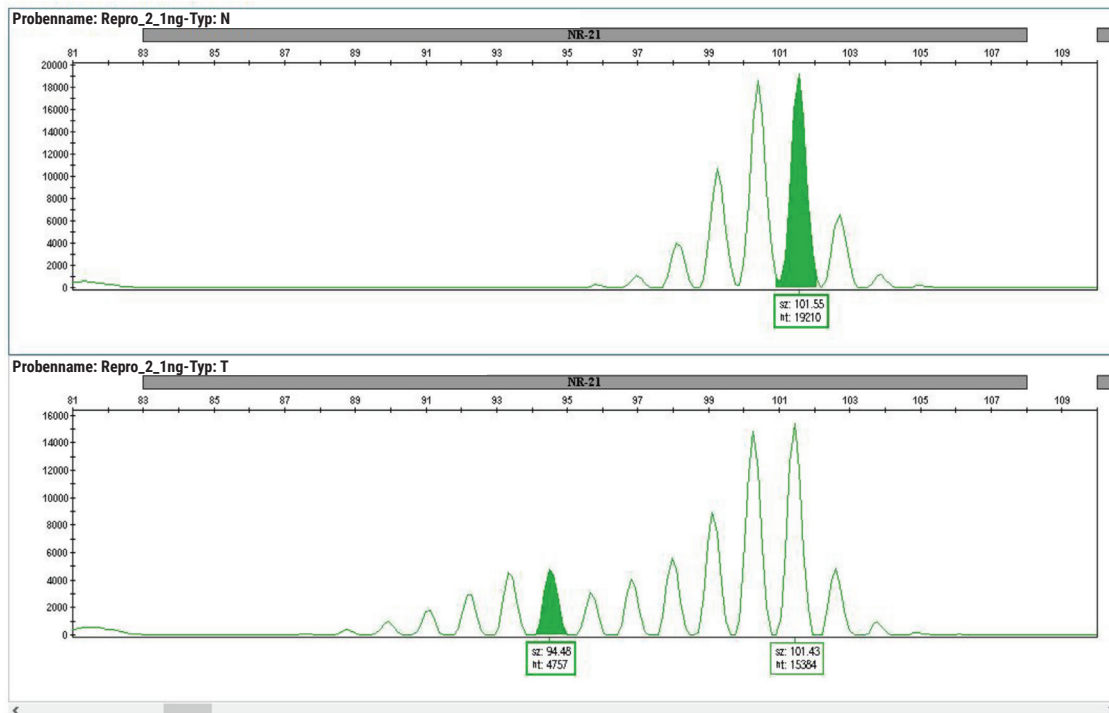


Abbildung 2. Datenbeispiel für das OncoMate® MSI Dx Analysis System. Ein DNA-Template eines einzelnen Genoms (1 ng) wurde mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifiziert und die PCR-Produkte wurden mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit POP-7® Polymer und einem 50-cm-Kapillar-Array analysiert. **Panel A.** Ein Elektropherogramm, das den simultanen Nachweis aller fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente zeigt. **Panels B–E.** Mikrosatellitendaten, die vom Detektionskanal angezeigt werden und eine einfachere Interpretation ermöglichen. Panel E veranschaulicht die Fragmentpeaks des Size Standard 500.



16114TA

Abbildung 3. Stabilitätsbeurteilung von Mononukleotid-Markern. Im obigen Beispiel sind die interessierenden Mikrosatelliten-Allele hervorgehoben. Wenn für einen Mononukleotid-Marker die Größendifferenz zwischen dem neuen Allel in der Tumorseite und dem Referenzallel in der Normalgewebe-Seite mindestens 2,75 bp beträgt, wird der Marker als instabil interpretiert. In diesem Beispiel beträgt die Größe des Referenzallels in der Normalgewebe-Seite (oberes Elektropherogramm) 101,55 bp, während die Größe des neuen Allels in der Tumorseite (unteres Elektropherogramm) 94,48 bp beträgt. Der Größenunterschied zwischen diesen beiden Allelen beträgt 7,07 bp; dieser Unterschied entspricht $\geq 2,75$ bp, daher wird der NR-21-Marker als instabil interpretiert.

Mit Hilfe der Multiplex-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern werden alle sieben Mikrosatellitenregionen innerhalb derselben Reaktion amplifiziert, um farbstoffmarkierte PCR-Produkte zu erzeugen. Die PCR-Produkte und ein fluoreszenzmarkierter Größenstandard, Size Standard 500, werden anschließend dem Formamid zugesetzt und hitzedenaturiert. Die resultierende einzelsträngige DNA wird elektrokinetisch in ein Kapillarelektrophorese-Gerät injiziert. Hier werden die DNA-Fragmente nach Größe getrennt und durch die eingebrachten Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen. Die gemeinsame Analyse von Größenstandard und Mikrosatelliten-DNA-Fragmenten ermöglicht eine genaue Größenbestimmung und direkte Größenvergleiche zwischen den Proben. Nach der Kapillarelektrophorese können die vom Gerät generierten Dateien mit den DNA-Fragmentdaten (.fsa) mit einer Fragmentanalyse-Software analysiert werden, um die Fragmentgröße zu bestimmen und Allele zu identifizieren.

2. Produktkomponenten und Lagerbedingungen

2.1 Materialien, die mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System (Cat.# MD3140) geliefert werden



Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien reichen für 100 Reaktionen (50 gepaarte Reaktionen) aus.

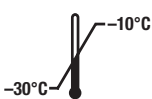
Die folgenden Materialien sind enthalten:

KOMPONENTE	MENGE	TEILENR.
OncoMate® MSI 5X Primer Mix	200 µl	MD705A

Inhalt: Fluorophor-markierte und unmarkierte Primer für BAT-26, Penta D, NR-21, BAT-25, MONO-27, NR-24 und Penta C in einer Pufferlösung.



Lagerbedingungen: Prä-Amplifikationsbereich; Verwendung. Vor Lichteinstrahlung schützen.

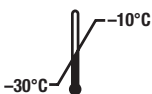


vor der Verwendung; 2°C nach erster

KOMPONENTE	MENGE	TEILENR.
OncoMate® MSI 5X Master Mix	200 µl	MD280A

Inhalt: GoTaq® MDx Hot Start DNA Polymerase, dNTPs, Magnesiumchlorid und -salze in einer Pufferlösung mit Stabilisatoren.

Lagerbedingungen: Prä-Amplifikationsbereich; Verwendung.

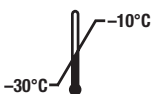


vor der Verwendung; 2°C nach erster

KOMPONENTE	MENGE	TEILENR.
2800M Control DNA, 10 ng/µl	25 µl	MD810A

Inhalt: Aus Zelllinie gewonnener männlicher genomischer DNA-Standard in einer Pufferlösung.

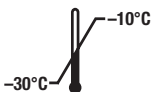
Lagerbedingungen: Prä-Amplifikationsbereich; Verwendung.



vor der Verwendung; 2°C nach erster

KOMPONENTE	MENGE	TEILENR.
Water, Amplification Grade	1,25 ml	MD193A

Lagerbedingungen: Prä-Amplifikationsbereich; Verwendung.



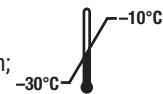
vor der Verwendung; 2°C nach erster

KOMPONENTE	MENGE	TEILENR.
Size Standard 500	100 µl	MD500A

Inhalt: Fluorophor-markierte DNA-Fragmente in einer Pufferlösung.



Lagerbedingungen: Post-Amplifikationsbereich; Verwendung. Vor Lichteinstrahlung schützen.



vor der Verwendung; 2°C nach erster

2.2 Lagerung und Handhabung des OncoMate® MSI Dx Analysis System

Lagern Sie alle Komponenten nach Erhalt bei -30 °C bis -10 °C in einem Gefrierschrank ohne automatische Abtaufunktion No Frost. Lagern Sie die 2800M Control DNA vor der ersten Verwendung mindestens 8 Stunden lang bei 2 °C bis 10 °C . Nach der ersten Verwendung lagern Sie das OncoMate® MSI Dx Analysis System bis zu 3 Monate lang bei 2 °C bis 10 °C . Der OncoMate® MSI 5X Primer Mix und Size Standard 500 sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln gelagert werden. Nicht erneut einfrieren. Lagern Sie die Prä- und Post-Amplifikationsreagenzien in separaten Räumen und verwenden Sie sie mit speziellen Pipetten, Röhrchen-Magazinen usw. Komponenten, die unter anderen als den auf den Etiketten angegebenen Bedingungen aufbewahrt werden, funktionieren unter Umständen nicht richtig und können die Ergebnisse beeinträchtigen.

2.3 Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Laborreagenzien

- DNA-Extraktionssystem (siehe Abschnitt 3.3 und 3.4)
- OncoMate® 5C Matrix Standard (Promega Cat.# MD3850)
- Hi-Di™ Formamide (z. B. Applied Biosystems Cat.# 4404307)
- Fluoreszenzfarbstoff-basierte dsDNA-Quantifizierungsreagenzien (siehe Abschnitt 3.4)
- Nuclease-Free Water (Promega Cat.# MC1191)

Hinweis: Es ist wichtig, hochwertiges Hi-Di™ Formamide zu verwenden. Frieren Sie Hi-Di™ Formamide in Aliquoten bei -30 °C bis -10 °C ein. Mehrere Frost-Tau-Zyklen oder eine Langzeitlagerung bei 2 bis 10 °C können zum Abbau von Formamid führen. Formamid von minderwertiger Qualität kann Ionen enthalten, die während der Injektion mit der DNA konkurrieren, was zu geringeren Peakhöhen und geringerer Sensitivität führt.

Labor-Verbrauchsmaterialien

Hinweis: Die folgende Laborausrüstung wird in zwei verschiedenen Bereichen des Labors benötigt: eine für Prä-Amplifikationsverfahren und eine für Post-Amplifikationsverfahren.

- Satz kalibrierter Präzisionspipetten, die $1\text{ }\mu\text{l}$ bis $1000\text{ }\mu\text{l}$ abgeben können
- Aerosolbeständige Pipettenspitzen ($10\text{ }\mu\text{l}$ bis $1000\text{ }\mu\text{l}$)
- $1,5\text{-ml}$ -Mikrozentrifugenröhrchen
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Thermo Fisher Scientific Cat.# 4306737)
- MicroAmp® 8-Cap Strip, clear (Thermo Fisher Scientific Cat.# N8010535) (nur Prä-Amplifikation)
- Eigene Mikrozentrifuge („Minizentrifuge“)
- Zentrifuge kompatibel mit 96-Well-Platten (z. B. Miniplattenzentrifuge)
- Magazine für Mikrozentrifugenröhrchen
- Vortexmischer
- Gefrierschrank ohne automatische Abtaufunktion bei -30 °C bis -10 °C
- Kühlschrank bei 2 °C bis 10 °C
- Zerstoßenes Eis (nur Post-Amplifikation)
- DNA-Extraktionsgeräte (z. B. Wärmeblöcke, Zentrifugen), basierend auf der ausgewählten Methode (nur Prä-Amplifikation)

Geräte und Zubehör

- DNA-Extraktionsgerät, wenn das Verfahren automatisiert ist
- DNA-Quantifizierungsgerät und zugehörige Verbrauchsmaterialien
- Kapillarelektrophorese-Gerät und zugehörige Verbrauchsmaterialien
- Mit 96-Well-Platten kompatibler Thermocycler

Software

- Fragmentanalyse-Software (d. h. Software, die in der Lage ist, .fsa-Dateien von einem Kapillarelektrophorese-Gerät zu analysieren)

3. Bevor Sie beginnen

3.1 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



Warnhinweis zur Chemikaliensicherheit: Einige Reagenzien, die während der Fragmentanalyse verwendet werden, sind potenziell gefährlich. Handhaben und entsorgen Sie Gefahrenstoffe gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung. Formamid (siehe Abschnitt 2.3, Nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien) ist ein Reizmittel und ein Teratogen; vermeiden Sie das Einatmen und den Kontakt mit der Haut. Lesen Sie den Warnhinweis und treffen Sie geeignete Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit dieser Substanz. Tragen Sie beim Umgang mit Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille. Lesen Sie vor der Verwendung das vom Hersteller zur Verfügung gestellte Sicherheitsdatenblatt für Formamid.

Hinweis zum Sicherheitsdatenblatt: Im Sicherheitsdatenblatt (SDS) sind wichtige Informationen zur sicheren Handhabung, Transport und Entsorgung dieses Produkts enthalten. SDS für alle in den Kits enthaltenen Reagenzien sind online verfügbar unter: www.promega.com/resources/msds/ oder auf Anfrage bei Promega Technical Services: genetic@promega.com

Vorsichtsmaßnahmen zur Biosicherheit: Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist für die Verwendung mit Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben vorgesehen. Befolgen Sie die von Ihrer Einrichtung festgelegten Richtlinien für die Handhabung und Entsorgung dieser Gewebe.

PCR-Vorsichtsmaßnahmen: Die Qualität der aufgereinigten DNA, kleine Veränderungen der Puffer, die Ionenstärke, die Primer-Konzentrationen, das Reaktionsvolumen, die Wahl des Thermocyclers und die Bedingungen des Thermocyclings können den Erfolg der PCR beeinflussen. Daher erfordert das OncoMate® MSI Dx Analysis System die strikte Einhaltung der in diesem Handbuch beschriebenen empfohlenen Verfahren zur Amplifikation und Fluoreszenzdetektion.

Minimierung der Kontamination: Bei der PCR-basierten Mikrosatellitenanalyse kann eine Kontamination durch sehr geringe Mengen an menschlicher DNA auftreten. Bei der Herstellung von Template-DNA, der Handhabung von Kit-Komponenten, der Zusammenstellung von Amplifikationsreaktionen und der Analyse von Amplifikationsprodukten ist äußerste Sorgfalt geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Lagern und verwenden Sie Reagenzien und Materialien, die vor der Amplifikation (OncoMate® MSI 5X Master Mix, OncoMate® MSI 5X Primer Mix, 2800M Control DNA und Water, Amplification Grade) verwendet werden, getrennt von denen nach der Amplifikation (Size Standard 500), in verschiedenen Räumen. Bereiten Sie Amplifikationsreaktionen in einem Raum vor, der speziell für Reaktionsverfahren vorgesehen ist. Verwenden Sie Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien, die für Amplifikationsverfahren vorgesehen sind. Integrieren Sie bei diesen Verfahren immer eine Negativ-Kontrollreaktion (d. h. kein Template) zum Nachweis der Reagenzienkontamination und eine Positiv-Kontrollreaktion zum Nachweis der Reagenzienleistung. Tragen Sie Handschuhe und verwenden Sie aerosolbeständige Pipettenspitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

3.2 Probenanforderungen

Gewebesektionen, die für die Verwendung mit dem Assay geeignet sind, werden unter Verwendung von 10 % neutral gepuffertem Formalin nach pathologischen Standardpraktiken hergestellt und enthalten ausreichend kernhaltige Zellen und einen Tumorgehalt von ≥ 20 % Tumorzellen, basierend auf einer pathologischen Prüfung. Die Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde unter Verwendung von DNA durchgeführt, die mit dem Maxwell® CSC Instrument und dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit aus FFPE-Gewebeproben eines kolorektalen Karzinoms extrahiert wurde, die diese Kriterien erfüllen.

3.3 DNA-Extraktionsmethoden und DNA-Qualitätsanforderungen

Der Erhalt von ausreichend hochwertiger DNA aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben kann problematisch sein. Die Qualität DNA kann aufgrund einer verlängerten oder ungeeigneten Fixierung der Gewebeprobe vor der Einbettung in Paraffin degradiert sein, und Amplifikationsinhibitoren aus der FFPE-Probe oder der Extraktionsmethode können im Extraktionsprozess übertragen werden. Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, die Kompatibilität der ausgewählten DNA-Aufreinigungsmethode mit diesem Assay zu überprüfen. Mithilfe von PCR-Assay-Kontrollen kann das Vorhandensein von Amplifikationsinhibitoren in aufgereinigten DNA-Extrakten überprüft werden.

Die Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System erfolgte mittels Verwendung von DNA, die aus FFPE-Gewebeproben eines kolorektalen Karzinoms extrahiert wurde. Hierzu wurde das Maxwell® CSC DNA FFPE Kit (Cat.# AS1350) in Kombination mit dem Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000) verwendet. DNA, die mit dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit und dem Maxwell® CSC oder CSC 48 Instrument aufgereinigt wurde, ist vor dem Test bei einer Lagerung bei 4 °C bis zu 14 Tage und bei einer Lagerung bei -20 °C bis zu einem Monat haltbar. Bei Verwendung einer anderen DNA-Extraktionsmethode sollten Benutzer die Gebrauchsanweisung des jeweiligen DNA-Extraktionssystems lesen, um Informationen zur DNA-Stabilität zu erhalten. Es wurde nachgewiesen, dass das Vorhandensein von bis zu 5 % Ethanol oder bis zu 50 μ M Guanidinhydrochlorid in der extrahierten DNA die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System nicht beeinträchtigt.

3.4 DNA-Quantitätsanforderungen

Der OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit ist für die Verwendung mit 1 ng DNA vorgesehen. Die DNA muss vor der Verwendung quantifiziert werden. UV-Absorptionsmessungen sind unzuverlässig für die Quantifizierung von dsDNA, die aus FFPE-Gewebeproben aufgereinigt wurde. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wird die Verwendung eines fluoreszierenden dsDNA-bindenden Farbstoffs oder eine quantitative PCR empfohlen. Beide Methoden ermöglichen eine zuverlässigere Quantifizierung der aus FFPE-Gewebeproben aufgereinigten DNA, insbesondere wenn die DNA-Konzentrationen niedrig sind oder wenn die DNA-Eluat typische Verunreinigungen enthalten (z. B. RNA, freie Nukleotide, Lösungsmittel, Reinigungsmittel, Proteine oder Salze).

Die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde mit CRC-DNA-Proben bewertet, die anhand von dsDNA-bindenden Farbstoffen quantifiziert wurden, wodurch dsDNA-Konzentrationen von nur 0,05 ng/ μ l exakt gemessen werden können. Während der Leistungsbewertung wurde die DNA mit dem QuantiFluor® dsDNA System (Best.-Nr. E2670) quantifiziert, das für den allgemeinen Laborgebrauch bestimmt ist.

3.5 Anforderungen an den Thermocycler

Die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde mit den Thermocyclern Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® und Bio-Rad C1000 Touch™ bewertet, die die folgenden Mindestspezifikationen erfüllen:

Maximale Block-Rampingrate: 3,9 °C/Sekunde bis 5 °C/Sekunde

Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,25$ °C (bei ≥ 90 °C)

Temperaturgleichmäßigkeit: $< 0,5$ °C (bei ≥ 90 °C)

Beheizter Deckel, der 103 °C bis 105 °C erreichen kann

Die Ergebnisse dieses Assays können durch den Einsatz von Thermocyclern mit Spezifikationen außerhalb der angegebenen Bereiche negativ beeinflusst werden.

3.6 Anforderungen an das Kapillarelektrophorese-Gerät

Die Amplifikationsprodukte des OncoMate® MSI Dx Analysis System werden mittels Kapillarelektrophorese nach Fragmentlänge (Größe) separiert. Abgesehen von der Auswahl eines Farbstoffsets, das auf der AnyDye-Methode zur Spektralkalibrierung basiert, wurde die standardmäßige Fragment-Analysemethode der Datenerfassungssoftware zur Fragmentanalyse verwendet, und die Injektionszeit wurde variiert, um die entsprechenden Fragmentpeakhöhen zu erreichen. Bei der 2800M Control DNA wurde für die sieben OncoMate® MSI Dx Analysis System-Marker eine Peakhöhe von ca. 8000 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angestrebt. Die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer unter Verwendung von POP-7® Polymer und einem 50-cm-Kapillar-Array bewertet. Die bei der Leistungsbewertung verwendeten Laufbedingungen sind in Anhang B (Abschnitt 11.2) aufgeführt. Kapillarelektrophorese-Geräte, die für die Verwendung mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System kompatibel sind, müssen folgende Spezifikationen einhalten:

Anzahl der erkannten Farbstoffe: ≥ 5

Kapillar-Array-Länge: Array-Längen, die für eine Einzelbasen-Auflösung geeignet sind, einschließlich 50 cm

Separationsmatrix: POP-7® oder gleichwertiges Produkt

Anregungswellenlänge (ungefähr): 480 nm bis 520 nm

Detektionsoptik: Promega-Farbstoffe erfordern eine Emissionserfassung von ca. 500 nm bis 630 nm

Auflösungsbereich: 1-bp-Auflösung von 60 bp bis ≥ 300 bp

Sizing-Genauigkeit (Wiederholbarkeit, ausgedrückt als Standardabweichung): $\leq 0,15$ bp über einen Bereich von 60 bp bis ≥ 300 bp

Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, die Kompatibilität des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts und der Analysemithe mit den Amplifikationsprodukten des OncoMate® MSI Dx Analysis System sicherzustellen.

3.7 Anforderungen an die Spektralkalibrierung des Kapillarelektrophorese-Geräts

Führen Sie vor der ersten Verwendung eine Spektralkalibrierung des Kapillarelektrophorese-Geräts mit dem OncoMate® 5C Matrix Standard (Cat.# MD3850) durch. Die Spektralkalibrierung erfolgt gemäß dem *Technischen Handbuch zum OncoMate® 5C Matrix Standard* Nr. TM597 unter Verwendung der Bedienungsanleitung des Kapillarelektrophorese-Geräts. Dieses Verfahren liefert die Daten, die das Kapillarelektrophorese-Gerät benötigt, um die überlappenden Fluoreszenzsignale der verschiedenen farbstoffmarkierten DNA-Fragmente des OncoMate® MSI Dx Analysis System aufzulösen. Die bei der Leistungsbewertung verwendeten Kalibrierungseinstellungen sind in Anhang A (Abschnitt 11.1) aufgeführt. Führen Sie eine neue Spektralkalibrierung gemäß den Empfehlungen des Herstellers des Kapillarelektrophorese-Geräts durch. So ist beispielsweise nach jeder größeren Wartung eines Kapillarelektrophorese-Systems, wie dem Wechsel der Anregungsquelle (z. B. Laser), dem Kalibrieren oder Ersetzen der Optik, der Änderung des Polymertyps oder des Kapillar-Arrays, eine neue Spektralkalibrierung erforderlich.

3.8 Anforderungen an die Datenanalyse-Software

Für die Analyse von Kapillarelektrophorese-Daten des OncoMate® MSI Dx Analysis System wird eine Fragmentanalyse-Software benötigt. Eine geeignete Fragmentanalyse-Software unterstützt Fragmentdaten (.fsa), berechnet die Fragmentgröße nach der Local Southern-Methode, ordnet Fragmente einem Marker nach Größenbereich und Fluoreszenzmarkierung (d. h. Farbe) zu, tabelliert und zeigt Daten aus einer Mischung von Fragmentgrößen (≥ 65 bp bis 300 bp) und Farben (≥ 5) an und druckt und exportiert analysierte Daten entsprechend der berechneten Allelgröße und Marker. Eine geeignete Software zeigt zudem Informationen zur Datenqualität (z. B. Off-scale-Peaks) an, die während der Kapillarelektrophorese erfasst wurden, und berechnet basierend auf benutzerdefinierten Einstellungen grundlegende QC-Parameter (z. B. Identifizierung breiter Peaks).

Die bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System generierten Daten wurden mit der GeneMapper® Software Version 5.0 und den in Anhang C (Abschnitt 11.3) aufgeführten Analysemethoden-Einstellungen analysiert.

3.9 Anforderungen an analytische Schwellenwerte

Vor der Datenanalyse muss der Benutzer den analytischen Schwellenwert (d. h. Detektionsschwellenwert) des Assays festlegen. Der analytische Schwellenwert definiert den RFU-Wert, ab dem Probensignale vom Geräterauschen unterschieden werden können, so dass der Benutzer Fragmentdaten sicher analysieren kann. Die Festlegung eines analytischen Schwellenwerts ist entscheidend, um die Qualität der Patientendaten zu gewährleisten (siehe Abschnitt 7.5). Geeignete Verfahren zur Bestimmung des analytischen Schwellenwerts finden Sie in der technischen Literatur (z. B. Bregu, 2013). Bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer verwendeten wir für alle Farbkanäle einen analytischen Schwellenwert von 175 RFU, der mithilfe des Ansatzes zur oberen Grenze bestimmt wurde, der auf einer linearen Regression von Peak-Intensitäten aus Proben mit unterschiedlichen DNA-Inputs beruht (Bregu, 2013).

4. Assay-Protokoll

Bewahren Sie die Prä-Amplifikationsreagenzien und die Post-Amplifikationsreagenzien in getrennten Räumen auf. Bereiten Sie die DNA-Template-Lösungen und Amplifikationsreaktionen in einem Raum vor, der speziell für Reaktionsverfahren vorgesehen ist. Verwenden Sie Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien, die für Amplifikationsverfahren vorgesehen sind. Tragen Sie Handschuhe und verwenden Sie aerosolbeständige Pipettenspitzen, um DNA-Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Verwenden Sie eine frische Pipettenspitze für jedes Hinzufügen von DNA-Probe, 2800M Control DNA und Water, Amplification Grade (für Negativkontrollen) zu Amplifikationsreaktionen.

4.1 Verdünnung von FFPE-Gewebe-DNA-Extrakten

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System benötigt ein dsDNA-Input von 1,0 ng pro Reaktion, zugeführt in einem Volumen von 1 µl bis 6 µl. Wir empfehlen, die Verdünnung der DNA auf eine konstante Konzentration für alle Proben, sodass für jede Reaktion 1 ng DNA in einem konstanten Volumen zugegeben wird. Bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurden alle DNA-Templates auf 0,5 ng/µl verdünnt und jeder Reaktion wurden 2 µl verdünnte DNA zugegeben.

Führen Sie die folgenden Schritte bei DNA-Proben durch, die vor der Amplifikation verdünnt werden müssen:

1. Vortexieren Sie die DNA-Probe dreimal für jeweils 5 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie sie kurz (1 bis 2 Sekunden), falls erforderlich, in einer Minizentrifuge, um die Probe am Boden des Röhrchens zu sammeln.

Hinweis: Ein unzureichendes Mischen von DNA-Proben und -Verdünnungen kann zu Quantifizierungsfehlern und einer schlechten Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System führen.

2. Verdünnen Sie die DNA-Probe in Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) auf eine geeignete Konzentration, um die Zugabe von 1,0 ng dsDNA zu jeder Amplifikationsreaktion im gewünschten Template-Volumen zu ermöglichen (siehe Abschnitt 4.3). Um die Genauigkeit zu maximieren, pipettieren Sie beim Verdünnen der Proben-DNA Volumen von ≥ 1 µl.

Hinweis: Verwenden Sie Nuclease-Free Water, wenn eine Probenverdünnung erforderlich ist. Die Effizienz der PCR-Amplifikation kann sich durch Änderungen des pH-Wertes (aufgrund der Zugabe von Tris-HCl) oder der verfügbaren Magnesiumkonzentration (aufgrund der Chelatbildung durch EDTA) in der Amplifikationsreaktion stark verändern, wenn Tris- oder Tris-EDTA-basierte Verdünnungsmittel verwendet werden. Ein unzureichendes Mischen von DNA-Proben und -Verdünnungen kann zu Quantifizierungsfehlern und einer schlechten Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System führen. Bereiten Sie für jeden Versuch neue DNA-Verdünnungen der Probe vor. Die Lagerung verdünnter Proben-DNA zur späteren Verwendung kann zu einer minderwertigen Amplifikation und zum Versagen des Assays führen.

4.2 2800M Control DNA-Verdünnung

Die 2800M Control DNA dient als Positiv-Amplifikationskontrolle (Abschnitt 7.3) und nicht als MSI-Kontrolle. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist zur Verwendung mit einem 2800M Control DNA-Input von 1,0 ng ausgelegt, das in einem Volumen von 1,0 µl bis 6,0 µl zugeführt wird. Lagern Sie die 2800M Control DNA (10 ng/µl) vor der Verwendung mindestens 8 Stunden lang bei 2 °C bis 10 °C. Wir empfehlen, die Kontroll-DNA auf die gleiche Konzentration wie die Testproben zu verdünnen. Bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx System wurde die 2800M Control DNA auf 0,5 ng/µl verdünnt und jeder Reaktion wurden 2 µl verdünnte DNA zugegeben.

1. Vortexieren Sie die 2800M Control DNA dreimal für je 10 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit.
2. Verdünnen Sie die 2800M Control DNA in Nuclease-Free Water (Cat. # MC1191) oder Water, Amplification Grade, sodass der Positiv-Kontrollreaktion 1,0 ng im gewünschten Volumen (1–6 µl) zugegeben wird. Beispiele für Verdünnungen finden Sie in Tabelle 2. Um die Genauigkeit zu gewährleisten, pipettieren Sie bei der Herstellung von 2800M Control DNA-Verdünnungen Volumen von $\geq 1\mu\text{l}$.

Tabelle 2. Verdünnung der 2800M Control DNA.

Volumen des DNA-Templates pro Reaktion	Volumen der 2800M Control DNA (10 ng/µl)	Wasservolumen 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

¹Nuclease-Free Water oder Water, Amplification Grade



Hinweis: Bereiten Sie für jeden Versuch eine frische 2800M Control DNA-Verdünnung vor. Die Lagerung verdünnter 2800M Control DNA zur späteren Verwendung kann zu einer minderwertigen Amplifikation der Positivkontrolle und zum Versagen des Assays führen.

4.3 Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System

1. Lassen Sie bei der ersten Verwendung die Komponenten OncoMate® MSI 5X Primer Mix, OncoMate® MSI 5X Master Mix und Water, Amplification Grade, vollständig auftauen. Nach der ersten Verwendung lagern Sie die Reagenzien bis zu 3 Monate lang bei 2 °C bis 10 °C.
2. Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz (1–2 Sekunden) in einer Minizentrifuge, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln, und vortexieren Sie die Reagenzien dreimal für je 3 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit. Zentrifugieren Sie die Reagenzien nicht nach dem Vortexieren, da dies zu einer ungleichmäßigen Konzentration der Reagenzien innerhalb des Röhrchens führen kann.
3. Kennzeichnen Sie eine neue MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode.
4. Bestimmen Sie die Anzahl der zusammenzustellenden Reaktionen. Dies muss für jede verarbeitete Platte mindestens eine Positiv-Amplifikationskontrollreaktion und eine Negativ-Amplifikationskontrollreaktion umfassen. Fügen Sie zusätzliche Reaktionen hinzu, um den Pipettierfehler zu kompensieren. Obwohl bei diesem Ansatz eine kleine Menge jedes Reagenzes verbraucht wird, stellt er sicher, dass für alle Proben genügend PCR-Amplifikationsmischung zur Verfügung steht.
5. Stellen Sie die PCR-Amplifikationsmischung wie in Tabelle 3 beschrieben zusammen. Geben Sie das finale Volumen an Water, Amplification Grade, OncoMate® 5X Master Mix und OncoMate® 5X Primer Mix in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen. Die Template-DNA wird in Schritt 7 einzeln zur Reaktion hinzugefügt.

Hinweis: Tabelle 3 setzt voraus, dass das DNA-Template der Reaktion in Schritt 7 in einem für alle Proben konstanten Volumen zugeführt wird.

Tabelle 3. Zusammensetzung einer PCR-Amplifikationsmischung.

Komponenten der PCR-Amplifikationsmischung ¹	Volumen pro Reaktion	×	Anzahl der Reaktionen	=	Finales Volumen
Water, Amplification Grade	auf finales Volumen von 10 µl	×		=	
OncoMate® MSI 5X Master Mix ²	2 µl	×		=	
OncoMate® MSI 5X Primer Mix	2 µl	×		=	
Template-DNA (1,0 ng)	bis zu 6 µl				
Gesamtvolumen der Reaktion	10 µl				

¹Geben Sie Water, Amplification Grade, OncoMate® 5X Master Mix und OncoMate® 5X Primer Mix in ein frisches 1,5-ml-Röhrchen. Die Template-DNA wird in Schritt 7 einzeln zu jedem Reaktions-Well hinzugefügt.

²Im OncoMate® MSI 5X Master Mix kann sich ein Präzipitat bilden. Das Vorhandensein des Präzipitats hat keinen Einfluss auf die DNA-Amplifikation mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System.

6. Vortexieren Sie die PCR-Amplifikationsmischung dreimal für jeweils 3 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und pipettieren Sie dann in jedes für Proben und Kontrollen verwendete Well der Reaktionsplatte(n) die für eine Reaktion benötigte Menge an PCR-Amplifikationsmischung.
Hinweis: Wenn die PCR-Amplifikationsmischung nicht ausreichend vortexiert wird, kann dies zu einer minderwertigen Amplifikation oder einer Unausgewogenheit zwischen den verschiedenen Markern führen. Geben Sie die PCR-Amplifikationsmischung in die Wells der Reaktionsplatte, sobald die Mischung hergestellt ist. Fahren Sie umgehend mit den Schritten 7 bis 10 fort und führen Sie sofort im Anschluss ein Thermocycling durch.
7. Vortexieren Sie jede verdünnte FFPE-Template-DNA (vorbereitet in Abschnitt 4.1) dreimal für jeweils 5 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie sie kurz (1–2 Sekunden) in einer Minizentrifuge, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens ansammelt. Pipettieren Sie 1,0 ng der Probe in das dafür vorgesehene Well auf der Platte mit der PCR-Amplifikationsmischung. Mischen Sie die Komponenten durch mehrmaliges Pipettieren.
8. Vortexieren Sie die verdünnte 2800M Control DNA (vorbereitet in Abschnitt 4.2) dreimal für jeweils 10 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie sie kurz (1–2 Sekunden) in einer Minizentrifuge, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens ansammelt. Pipettieren Sie 1,0 ng der 2800M Control DNA-Verdünnung in das bzw. die Wells, die für die Positiv-Kontrollreaktionen reserviert sind. Mischen Sie die Komponenten durch mehrmaliges Pipettieren.
9. Pipettieren Sie für die Negativ-Amplifikationskontrolle ein dem Template-DNA-Volumen entsprechendes Volumen an Water, Amplification Grade in das bzw. die Well(s), das/die für die Negativ-Kontrollreaktionen reserviert ist/sind. Fügen Sie den Negativ-Kontrollreaktionen keine Template-DNA hinzu. Mischen Sie die Komponenten durch mehrmaliges Pipettieren.
Hinweis: Wenn keine Negativ- und Positivkontrollreaktionen amplifiziert und analysiert werden, kann dies zu Ungewissheiten bei der Analyse der Ergebnisdaten führen und die Fehlerbehebung erschweren. Positiv- und Negativ-Kontrollreaktionen müssen auf jeder Platte enthalten sein.
10. Verschließen Sie die Wells mit MicroAmp® 8-Cap Strips und zentrifugieren Sie sie kurz in einer Miniplattenzentrifuge, um den Inhalt am Boden der Wells zu sammeln und Luftblasen zu entfernen.

4.4 Thermocycling

1. Stellen Sie sicher, dass der beheizte Deckel die programmierte Temperatur (103–105 °C) erreicht hat und legen Sie die Reaktionsplatte in den Thermocycler. Schließen Sie den Deckel des Thermocyclers.
2. Programmieren Sie den Thermocycler gemäß den Anweisungen des Herstellers, um das in Abbildung 4 angegebene Protokoll auszuführen. Stellen Sie sicher, dass das Reaktionsvolumen auf 10 µl eingestellt ist. Die Zeit für das Cycling einschließlich Ramping beträgt insgesamt ca. 1 Stunde und 15 Minuten.

Thermocycling-Protokoll¹

96 °C für 1 Minute, dann:

96 °C für 10 Sekunden

58 °C für 1 Minute

72 °C für 30 Sekunden

für 29 Zyklen, dann:

60 °C für 10 Minuten, dann:

4 °C beibehalten

¹Reaktionsvolumen: 10 µl; Beheizter Deckel: 103 ° bis 105 °C

Abbildung 4. Thermocycling-Protokoll für das OncoMate® MSI Dx Analysis System.

3. Fahren Sie nach Abschluss des Thermocycling-Protokolls mit der Fragmentanalyse anhand einer Kapillarelektrophorese fort oder lagern Sie die Amplifikationsprodukte lichtgeschützt über Nacht bei 2 °C bis 10 °C oder für einen längeren Zeitraum bei –30 °C bis –10 °C.



Hinweis: Die Langzeitlagerung amplifizierter Proben bei Temperaturen über –10 °C kann zu Artefakten führen, die die Datenanalyse beeinträchtigen.

4.5 Vorbereitung des Kapillarelektrophorese-Geräts



Siehe Abschnitt 3.6 für die Anforderungen an die Kapillarelektrophorese-Geräte. Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers für den Betrieb und die Wartung des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts und die Verwendung eines geeigneten Polymers und Kapillar-Arrays.

1. Stellen Sie sicher, dass das Gerätepolymer und die Puffer nicht abgelaufen sind und dass eine ausreichende Anzahl von Proben oder Injektionen zur Verfügung steht, um die geplante Analyse abzuschließen.
2. Heizen Sie gegebenenfalls den Kapillarelektrophorese-Ofen nach Herstellerangaben mindestens 30 Minuten vor Beginn eines Laufs vor.

4.6 Vorbereitung der vom OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifizierten Fragmente zur Kapillarelektrophorese

1. Wenn amplifizierte Proben bei –30 °C bis –10 °C gelagert wurden, müssen Sie sie vollständig auftauen, bevor Sie fortfahren. Vortexieren Sie die Platte 5 Sekunden lang und zentrifugieren Sie sie für 5 bis 10 Sekunden in einer Miniplattenzentrifuge, damit sich der Inhalt am Boden der Wells ansammelt.
2. Bestimmen Sie die Anzahl der Wells, die zur Analyse aller amplifizierten Proben erforderlich sind, einschließlich der Positiv- und Negativ-Kontrollreaktionen. Addieren Sie zu dieser Anzahl die nicht verwendeten Wells, aus denen eine Injektion initiiert wird, plus zusätzlicher Wells zur Kompensation von Pipettierungsfehlern.
3. Vortexieren Sie den Size Standard 500 dreimal für jeweils 3 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und bereiten Sie den Kapillarelektrophorese-Ladecocktail gemäß Tabelle 4 vor.



Hinweis: Formamid ist ein Reizmittel und ein Teratogen; vermeiden Sie das Einatmen und den Kontakt mit der Haut. Lesen Sie den Warnhinweis und treffen Sie geeignete Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit dieser Substanz. Tragen Sie beim Umgang mit Formamid immer Handschuhe und eine Schutzbrille.

Tabelle 4. Vorbereitung des Kapillarelektrophorese-Ladecocktails.

Ladecocktail	Volumen pro Well	×	Anzahl der Wells	=	Finales Volumen
Hi-Di™ Formamide	9,5 µl	×		=	
Size Standard 500	0,5 µl	×		=	
Gesamtvolumen	10 µl				

4. Vortexieren Sie den Ladecocktail dreimal für jeweils 3 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit und zentrifugieren Sie ihn kurz (1–2 Sekunden) in einer Minizentrifuge, damit sich die Reagenzien am Boden des Röhrchens ansammeln.
5. Pipettieren Sie jeweils 10 µl des Ladecocktails in die für das ausgewählte Kapillarelektrophorese-Gerät erforderlichen Wells einer MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate.

Hinweis: Jedem Well, aus dem eine Injektion initiiert wird, muss ein Ladecocktail oder Hi-Di™ Formamide zugesetzt werden, unabhängig davon, ob dem Well Amplifikationsprodukte zugesetzt werden oder nicht. Wenn kein Ladecocktail oder Hi-Di™ Formamide in ein Well gegeben wird, das injiziert wird, kann dies zu einer Beschädigung des Kapillar-Arrays und einem Lauffehler führen.

6. Fügen Sie allen zugewiesenen Wells 1 µl der amplifizierten Probe oder der Kontrollreaktion hinzu.
7. Decken Sie die Wells gemäß den Anweisungen des Geräteherstellers mit Septen ab.
8. Zentrifugieren Sie die Platte 5 bis 10 Sekunden lang, um das Formamid-Probengemisch am Boden der Wells zu sammeln und Luftblasen zu entfernen.
9. Denaturieren Sie die Proben für 3 Minuten bei 95 °C in einem Thermocycler und kühlen Sie die Reaktionsplatte im Anschluss sofort für mindestens 3 Minuten auf zerstoßenem Eis. Denaturieren Sie die Proben kurz vor dem Laden der Platte das Kapillarelektrophorese-Gerät.

Hinweis: Schließen Sie nicht den beheizten Deckel des Thermocyclers, da dadurch die Septen der Platte geschmolzen werden können.

10. Laden Sie die Platte gemäß den Anweisungen des Herstellers in das Kapillarelektrophorese-Gerät. Stellen Sie gegebenenfalls sicher, dass der Ofen vor dem Beladen die erforderliche Temperatur erreicht hat.

4.7 Nachweis von amplifizierten Fragmenten durch Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion

Informationen zur Durchführung eines Fragmentanalyse-Laufs, einschließlich der Konfiguration der Spektralkalibrierungs- und Fragmentanalyse-Methoden, des Hinzufügens von Probeninformationen, des Ladens denaturierter Proben in das Gerät, des Initiierens eines Laufs und des Abrufens von Daten für einen abgeschlossenen Lauf, finden Sie im technischen Handbuch des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts. Beginnen Sie bei der Programmierung des Geräts mit der Standard-Fragmentanalyse-Methode für die spezifische Gerätekonfiguration. Es kann eine Optimierung der Injektionszeit erforderlich sein, um den individuellen Anforderungen des Labors gerecht zu werden. Der Benutzer ist dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass die zur Kapillarelektrophorese ausgewählten Bedingungen mit dem Assay kompatibel sind. Wenden Sie sich an Ihre lokale Promega-Niederlassung oder Ihren Vertriebspartner oder senden Sie eine E-Mail an: **genetic@promega.com**, um weitere Informationen zu erhalten.

5. Datenanalyse

5.1 Einführung

Die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese der Amplifikationsprodukte des OncoMate® MSI Dx Analysis System werden als Daten in (.fsa-)Dateien ausgegeben. Für die nachfolgende Analyse dieser Daten ist eine Fragmentanalyse-Software erforderlich (Abbildung 5). Die Ziele der Datenanalyse sind die Bereitstellung grundlegender Informationen über die Datenqualität, Fragmentgrößenpeaks des definierten Analysebereichs, die Unterstützung beim Filtern von „Stutter-Peaks“ aus den bei den einzelnen Markern vorhandenen Allelpeaks und die Zusammenfassung der Allelgröße(n) nach Marker für die Ergebnisinterpretation. Führen Sie die folgenden Schritte aus, um die Daten der Kapillarelektrophorese mithilfe einer Fragmentanalyse-Software zu analysieren:

Einmalig vor der ersten Analyse durchzuführen; Anleitungen finden Sie in Anhang C (Abschnitt 11.3):

- Definieren Sie die bekannten Größen für die Größenstandard-Fragmente (d. h. erstellen oder importieren Sie den Size Standard-Assay)
- Weisen Sie den einzelnen Marken ihren Größenbereich für die Analyse zu (d. h. erstellen oder importieren Sie den Panel-Assay)
- Legen Sie die Analyseparameter fest (d. h. erstellen oder importieren Sie die Analysemethode)
- Optional: Verwalten Sie die Datenanzeige (d. h. erstellen oder importieren Sie Tabellen-, Diagramm- und Berichtseinstellungen)

Für alle analysierten Probenchargen durchzuführen; Anleitungen finden Sie in Abschnitt 5.2:

- Importieren Sie die Dateien mit den Daten
- Wählen Sie die Analyseeingaben aus (d. h. Size Standard-Assay, Panel-Assay und Analysemethode)
- Führen Sie die Datenanalyse durch
- Fassen Sie die Allelgrößen nach Marker zusammen

Zur Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde die GeneMapper® Software verwendet. Die endgültigen Einstellungen für die Datenanalyse, die bei der Leistungsbewertung des Assays verwendet wurden, sind in Anhang C (Abschnitt 11.3) als Referenz aufgeführt. Diese Einstellungen wurden optimiert, um das kleinste (in bp) unterschiedliche Allel für jeden Mononukleotid-Repeat-Marker zu identifizieren und es für die nachfolgende Analyse von Stutter-Fragmentpeaks zu unterscheiden. Unter bestimmten Umständen können unterschiedliche Allele in einer Probe gefiltert werden, wenn die empfohlenen Analyseereinstellungen verwendet werden. Diese gefilterten Allele werden nicht zur Bestimmung der Markerstabilität verwendet (siehe Abschnitt 6.4), da sie nicht das kleinste unterschiedliche Allel für diesen Marker sind. Der Workflow zur Analyse von Fragmentdaten ist in Abbildung 5 dargestellt und nachfolgend in Abschnitt 5.2 am Beispiel der GeneMapper® Software beschrieben. Weitere Anweisungen zur Analyse von Fragment-Daten mit der GeneMapper® Software finden Sie im *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide* von Thermo Fisher Scientific.

Hinweise:

1. Die Einstellungen der Analysemethode und der Panels für das OncoMate® MSI Dx Analysis System wurden unter Verwendung von Daten bestimmt, die mit einem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit POP-7® Polymer und einem 50-cm-Array generiert wurden. Die Analyse von Daten, die mit unterschiedlichen Konfigurationen von Kapillarelektrophorese-Geräten gewonnen wurden, kann modifizierte Panel- und Analysemethodendateien erfordern. Hilfe erhalten Sie von Ihrer lokalen Promega-Niederlassung oder Ihrem Vertriebspartner oder senden Sie eine E-Mail an: genetic@promega.com
2. Die in Anhang C aufgeführten Einstellungen der Analysemethode können als Modell dienen, um Analyseereinstellungen für Ihr Kapillarelektrophorese-System zu erstellen. Die analytischen Schwellenwerte („Peak Amplitude Thresholds“ (Peakamplituden-Schwellenwerte) unter der Registerkarte „Peak Detector“ (Peakdetektor) des GeneMapper® „Analysis Method Editor“ (Analysenmethoden-Editor)) müssen jedoch vom jeweiligen Labor basierend auf der angestrebten Proben-Peakintensität, dem Dynamikbereich des Geräts und dem in den analysierten Daten beobachteten Rauschen oder Hintergrundsignal bestimmt werden (siehe Abschnitt 7.5). Bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde ein analytischer Schwellenwert von 175 RFU für alle Farbkanäle (B, G, Y, O) verwendet. Analytische Schwellenwerte für geeignete Kapillarelektrophorese-Geräte liegen typischerweise zwischen 50 RFU und 200 RFU. Eine Erklärung für die richtige Verwendung und Wirkung der verschiedenen Analyseereinstellungen finden Sie im *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide* von Thermo Fisher Scientific.



Abbildung 5. Workflow für die Analyse von Kapillarelektrophorese-Daten aus dem OncoMate® MSI Dx Analysis System.

5.2 Analysieren von Daten

Nachfolgend finden Sie eine Anleitung zur Datenanalyse mit der GeneMapper® Software. Diese Anleitung geht davon aus, dass Sie die in Anhang C (Abschnitt 11.3) beschriebenen verfügbaren GeneMapper®-Einstellungsdateien importiert oder gleichwertige Einstellungsdateien erstellt haben. Wenn Sie eine andere Software zur Datenanalyse verwenden, lesen Sie die entsprechende Bedienungsanleitung für Informationen und Anleitungen.

1. Öffnen Sie die GeneMapper® Software, Version 5.0 oder 6.0.
2. Wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „New Project“ (Neues Projekt) () und wählen Sie den Projekttyp **Microsatellite (Mikrosatellit)** aus.
3. Importieren Sie die Daten, indem Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Add Samples To Project“ (Proben zu Projekt hinzufügen) () auswählen.
4. Wählen Sie im Dropdown-Menü „Table Setting“ (Tabelleneinstellung) in der Werkzeugleiste **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Tabelle_v1.0)** aus.
5. Wenn das Feld „Sample Type“ (Probentyp) noch nicht ausgefüllt ist, wählen Sie zur Beschreibung der einzelnen Proben **Sample (Probe)**, **Positive Control (Positivkontrolle)** oder **Negative Control (Negativkontrolle)** aus.
6. Wählen Sie für alle Kontroll- und Patientenproben für die „Analysis Method“ (Analysemethode) **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Analyse_v1.0)**, für das „Panel“ **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** und für den „Size Standard“ (Größenstandard) **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Größe_v1.0)** aus.
7. Wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Analyze“ (Analysieren) () aus, um alle Proben zu analysieren. Geben Sie bei Aufforderung im Popup-Fenster „Save Project“ (Projekt speichern) einen beschreibenden Namen für das Projekt ein und wählen Sie **OK**.

Hinweis: Nach der Analyse können die Proben über die Option **Sort... (Sortieren ...)** im Menü **Edit (Bearbeiten)** sortiert werden (z. B. nach **Sample Type (Probentyp)** und **Sample Name (Probenname)**). Die Neuordnung der Proben, sodass die Normalgewebe- und Tumorprobenpaare in der Probenliste nebeneinander angezeigt werden, ist von Vorteil, wenn Sie die bereitgestellte Datei „Plot Settings“ (Diagrammeinstellungen) (siehe Schritt 8) zur Anzeige und Überprüfung der Proben verwenden. Die Sortierung kann auch verwendet werden, um sicherzustellen, dass Elektropherogramme für das Normalgewebe- und das Tumorprobenpaar auf derselben Seite ausgedruckt werden (siehe Schritt 9.c).

8. Überprüfen Sie die Qualität der Kontroll- und Patientenproben wie in Abschnitt 6.3 beschrieben. Wählen Sie Zeilen mit den Kontroll- oder Patientenproben aus und wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Display Plots“ (Diagramme anzeigen) () aus, um Elektropherogramme und tabellarische Allelzeiten anzuzeigen. Wählen Sie im Dropdown-Menü „Plot Setting“ (Diagrammeinstellung) in der Werkzeugleiste **OncoMate_MSI_Dx_Plot_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Diagramm_v1.0)** aus.

Hinweis: Die Überprüfung von Proben-Elektropherogrammen ist notwendig, um die Datenqualität zu beurteilen. Wir empfehlen, zuerst die Kontrollen und dann die Patientenproben zu überprüfen. Wenn Kontrollproben zusammen mit Patientenproben ausgewählt werden und im Fenster „Samples Plot“ (Probendiagramm) kontinuierlich angezeigt werden, können diese nicht minimiert werden, und der Bildschirm wird überfüllt sein.

9. Überprüfen Sie gültige Patientenproben auf ihren MSI-Status, wie in den Abschnitten 6.4 und 6.5 beschrieben. Zeigen Sie die Probanddaten wie in Schritt 8 beschrieben an. Um die Dateninterpretation zu erleichtern, können Sizing-Daten für nachfolgende Analysen auf verschiedene Arten exportiert werden, einschließlich der hier beschriebenen.

Hinweis: Diese Datenexport-Optionen dienen nur zur Information. Es liegt in der Verantwortung des Labors, das den Test durchführt, das am besten geeignete Datenformat für die nachfolgende MSI-Statusbestimmung zu bestimmen. Hilfe zur Ausarbeitung einer Berichtsmethode für Ihr Labor erhalten Sie von Ihrer lokalen Promega-Niederlassung oder Ihrem Vertriebspartner oder senden Sie eine E-Mail an: **genetic@promega.com**

- a. Eine Textdatei mit gefilterten Allelgrößen und anderen Probanddaten kann wie folgt als „Genotypes Table“ (Genotypentabelle) exportiert werden:
 - i. Wählen Sie im Hauptbildschirm eine oder mehrere Patienten- und Kontrollproben aus und wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Display Plots“ (Diagramme anzeigen) () , um das Fenster „Samples Plot“ (Probendiagramm) zu öffnen.
 - ii. wenn die „Genotypes Table“ (Genotypentabelle) nicht unter dem/den Elektropherogramm(en) angezeigt wird, wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Genotypes Table“ (Genotypentabelle) () aus.
 - iii. Wählen Sie **Export Table (Tabelle exportieren)** aus dem Menü **File (Datei)** aus und speichern Sie die Datei für die nachfolgende Analyse.
- b. Eine Textdatei mit gefilterten Allelgrößen und anderen Probanddaten kann wie folgt als „Report“ (Bericht) exportiert werden:
 - i. Wählen Sie im Hauptbildschirm eine oder mehrere Patienten- und Kontrollproben aus und wählen Sie in der Werkzeugleiste das Symbol „Report Manager“ (Berichtsmanager) () , um das Fenster „Report Manager“ (Berichtsmanager) zu öffnen.
 - ii. Wählen Sie im Dropdown-Menü „Report Setting“ (Berichtseinstellung) in der Werkzeugleiste **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Bericht_v1.0)** aus.
 - iii. Wählen Sie **Export... (Exportieren ...)** aus dem Menü **File (Datei)** aus, geben Sie der Datei einen Namen und wählen Sie **Export (Exportieren)**.

Hinweis: Für den Export als „Genotypes Table“ (Genotypentabelle) stehen gegenüber einem „Report“ (Bericht) unterschiedliche Datenfelder zur Verfügung. Es können Felder hinzugefügt werden, um den spezifischen Anforderungen Ihres Labors gerecht zu werden, indem Sie die von OncoMate® bereitgestellten Dateien „Table Settings“ (Tabelleneinstellungen) oder „Report Settings“ (Berichtseinstellungen) im GeneMapper® Manager bearbeiten.

- c. Eine Zusammenfassung der Daten im portablen Dokumentenformat (.pdf) mit Elektropherogrammen und tabellarischen Allelgrößen kann wie folgt gespeichert werden:
 - i. Wählen Sie im Hauptbildschirm eine oder mehrere Patienten- und Kontrollproben aus und wählen Sie das Symbol „Display Plots“ (Diagramme anzeigen) () , um das Fenster „Samples Plot“ (Probendiagramm) zu öffnen.
 - ii. Wählen Sie **Print... (Drucken...)** aus dem Menü **File (Datei)**. Wählen Sie als „Print Service“ (Druckdienst) **Microsoft Print to PDF (Microsoft-Druckausgabe in PDF)** (oder vergleichbares) und **Landscape (Querformat)** als Ausrichtung. Wählen Sie **Print** (Drucken) und geben Sie einen Namen für die resultierende PDF-Datei an.

Hinweis: Während dieses Vorgangs können mehrere PDF-Dateien erzeugt werden, die unterschiedliche Dateinamen erfordern. Aus diesem Grund können Labore für jedes Probenpaar ein separates PDF speichern.

6. Überprüfung und Interpretation der Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden wichtige Punkte zur Beurteilung der Datenqualität und zur Interpretation des MSI-Status für Proben besprochen, die mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System analysiert wurden. Die Fragmentanalyse-Software kann verschiedene Optionen für die Datenanzeige und -überprüfung bieten. So bietet die GeneMapper® Software beispielsweise eine Reihe von Optionen zur Anzeige und Zusammenfassung von Probendaten. Weitere Informationen zur Überprüfung von Daten finden Sie im *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide* von Thermo Fisher Scientific.

6.1 Die OncoMate® MSI Dx Analysis System-Daten kennen

Bei der Analyse der OncoMate® MSI Dx Analysis System PCR-Produkte werden für jeden amplifizierten Mikrosatellitenbereich Daten zur DNA-Fragmentlänge ausgegeben. Die Daten eines zusammengehörenden Normalgewebe- und Tumorprobenpaares werden durch Auswertung der fünf Mononukleotid-Repeat-Marker (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 und MONO-27) und zweier Pentanukleotid-Repeat-Marker (Penta C und Penta D) interpretiert, die mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifiziert wurden.

Die Mononukleotid-Repeat-Marker werden analysiert, um den MSI-Status des Patienten zu bestimmen. Die Amplifikation von Mononukleotid-Repeat-Markern mittels PCR erzeugt einen Hauptallelpeak und eine annähernd glockenförmige Verteilung von flankierenden „Stutter-Peaks“, die jeweils durch 1 bp getrennt sind (Bacher, 2004). Innerhalb der Verteilung der einzelnen Stutter-Peaks ist der Peak mit dem höchsten Fluoreszenzwert (RFU) der Allelpeak (Abbildung 6). Eine Verteilung mit mehr als einem Stutter-Peak und Allel kann pro Marker entweder für Normal- (wenn heterozygot) oder für Tumorgewebeproben (wenn heterozygot oder instabil) vorhanden sein. Eine Fragmentanalyse-Software, wie z. B. die GeneMapper® Software, verwendet Peak-Filteralgorithmen, um die in den Markern vorhandenen Allele von den „Stutter“-Peaks zu isolieren. Die Größe dieser Allele wird auf einem Elektropherogramm angezeigt und zur nachfolgenden MSI-Interpretation tabellarisch dargestellt.

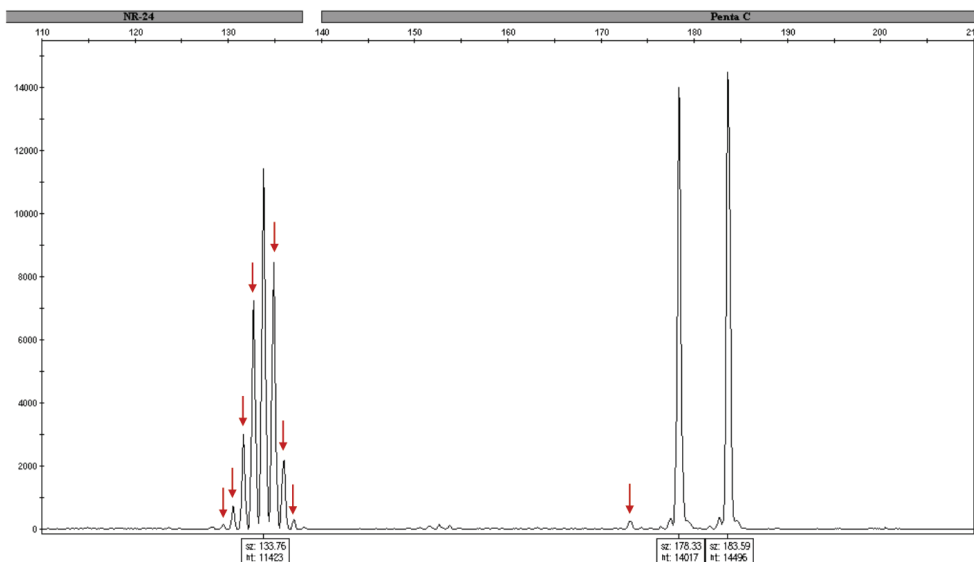


Abbildung 6. Bei den Mononukleotid-Markern, hier unter Verwendung des Markers NR-24 (links) dargestellt, sind deutliche Stutter-Peaks (gekennzeichnet durch Pfeile) erkennbar, die durch das Verrutschen der Polymerase während der PCR-Amplifikation von kurzen Tandem-Repeats entstehen. Sie treten in 1-bp-Intervallen zum echten oder höchsten Allelpeak auf. Bei den Pentanukleotid-Markern, hier unter Verwendung des Markers Penta C dargestellt, können auch wesentlich kleinere Stutter-Peaks, 5 bp von echten Allelpeaks entfernt, auftreten.

Wenn ein Marker in einer Tumorprobe instabil ist, sind ein oder mehrere neuartige Allele, die sich von den normalen Allelen unterscheiden, vorhanden (Abbildung 7). Ein Unterschied in der Allelgröße wird durch den Vergleich der Daten aus der Tumorprobe mit der dazugehörigen Normalprobe festgestellt. Tumorproben werden als MSI-H klassifiziert, wenn $\geq 40\%$ der Mononukleotid-Repeat-Marker neue Allele aufweisen (d. h., wenn ≥ 2 von 5 Markern „veränderte Allelprofile“ aufweisen). Tumorproben mit weniger als zwei veränderten Mononukleotid-Repeat-Markern können als MSS klassifiziert werden (Umar, 2004; Boland, 1998).

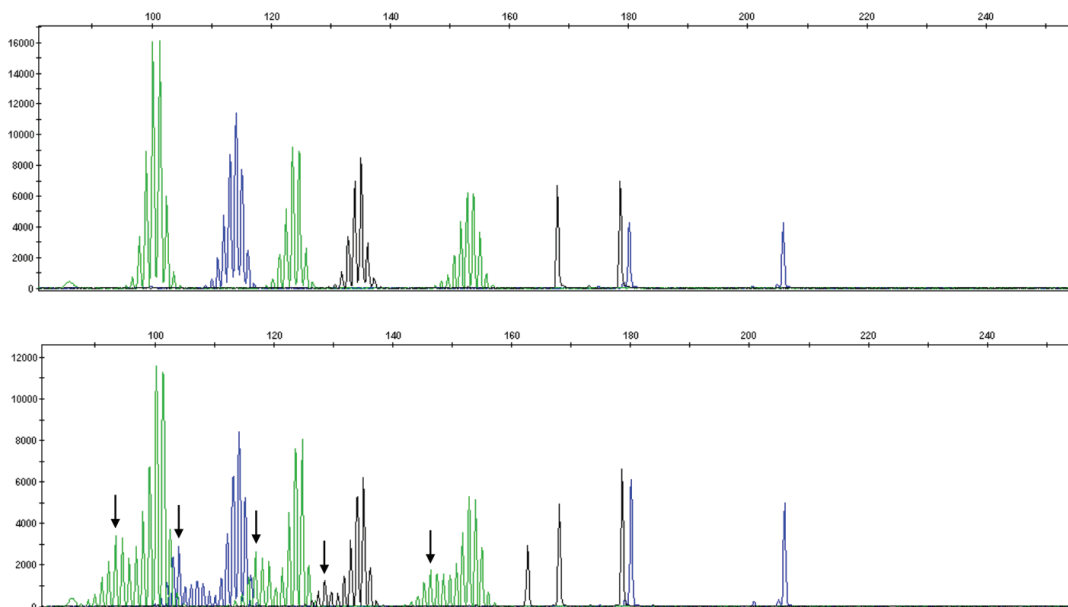


Abbildung 7. Zusammengehörende Normal- (oberes Panel) und Tumorproben (unteres Panel) eines Patienten wurden mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System analysiert. Ein Nanogramm der DNA wurde mit einem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit POP-7® Polymer und einer 50-cm-Kapillar-Array amplifiziert und analysiert. Das Vorhandensein neuer Allele in der Tumorprobe (gekennzeichnet durch Pfeile), die in der Normalgewebe-Referenzprobe nicht vorhanden waren, deutet auf eine Markerinstabilität hin. Die dargestellte Probe ist MSI-H, da ≥ 2 Mononukleotid-Repeat-Marker eine Instabilität aufweisen.

6.2 Übersicht über die bekannten Amplifikationsfehler und Anomalien bei der Kapillarelektrophorese

Bei der Verwendung von POP-7® Polymer und einem 50-cm-Kapillar-Array für die Kapillarelektrophorese wird innerhalb des NR-21-Markers ein bekanntes Amplifikationsartefakt als einzelner breiter Peak im Größenbereich von 83 bp bis etwa 90 bp beobachtet (Abbildung 8). Dieser Peak darf bei der Bestimmung der Stabilität des NR-21-Markers nicht als Allel betrachtet werden. Das Vorhandensein von Peaks mit niedriger Intensität und n-1-bp-Peaks ist bei den Pentanukleotid-Repeat-Markern, Penta D und Penta C typisch.

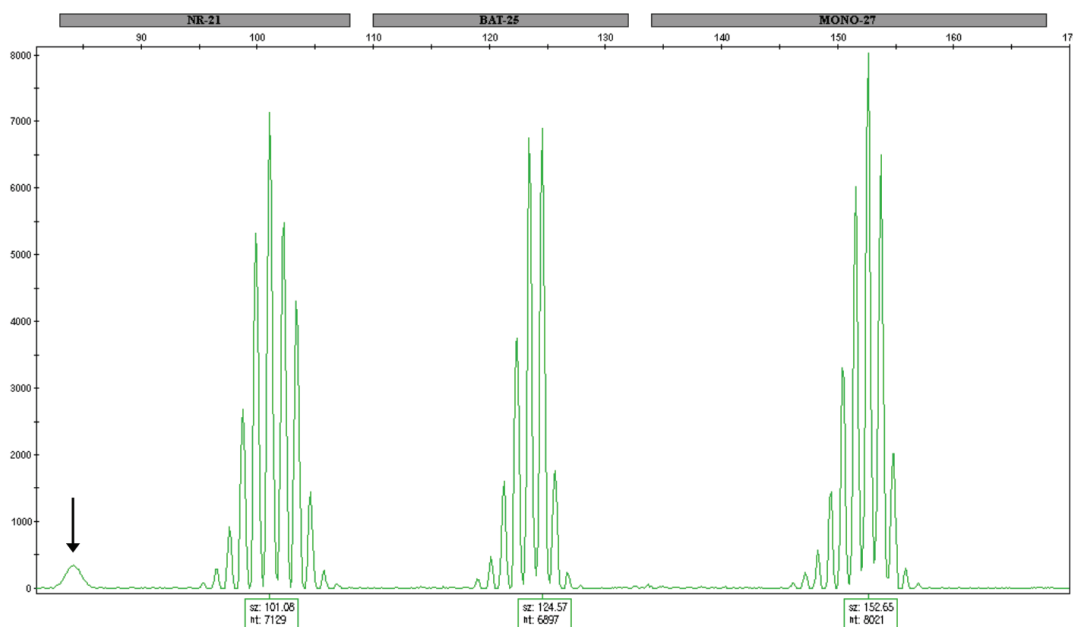


Abbildung 8. Innerhalb des NR-21-Markers kann ein Amplifikationsartefakt (gekennzeichnet durch einen Pfeil) als ein einzelner breiter Peak im Größenbereich von 83 bp bis etwa 90 bp beobachtet werden. Dieser Peak darf bei der Bestimmung der Stabilität des NR-21-Markers nicht als Allel betrachtet werden.

Es können weitere Amplifikationsartefakte auftreten, wenn zu viel DNA als Input beim OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendet wird. Das Basisliniensignal im BAT-26-Marker (blauer Kanal) wird dann möglicherweise erhöht und gezackt erscheinen. Abgesehen von extremen Inputs (z. B. ≥ 4 ng 2800M Control DNA), werden diese Artefakte bei der Identifizierung (d. h. Calling) von Allelen für den BAT-26-Marker herausgefiltert, wenn die vorgeschlagenen Peak-Filter-Parameter für die GeneMapper®-Analyse (siehe Anhang C) verwendet werden.

Es können auch andere bekannte, jedoch zufällige Anomalien während der Kapillarelektrophorese beobachtet werden. Dabei überwiegen drei dieser seltenen Anomalien: fehlgeschlagene Injektionen, breite Peaks und Signalspitzen.

- a. Wenn eine Injektion fehlschlägt, wird wenig oder keine Proben-DNA in den Kapillar-Array injiziert. In diesen Fällen ist eine nicht bestandene QC-Prüfung der Sizing-Qualität (siehe Tabelle 5) aufgrund des Fehlens (oder der schlechten Qualität) der Size Standard 500-Peaks zu beobachten. Die Sizing Quality (Sizing-Qualität) ist eine Funktion der GeneMapper® Software, bei der ein Score basierend auf der Peakform, der Größenübereinstimmung und der Size-Calling-Kurve berechnet wird. Die Einstellung ist unter der Analysemethode zu finden.
- b. Während der Kapillarelektrophorese kann ein Peak erkannt werden, der eine breite (d. h. nicht scharfe) Morphologie aufweist. Ein breiter Peak kann durch Kristalle oder andere anormale Materialien verursacht werden, die durch den Kapillar-Array migrieren.
- c. Bei der Kapillarelektrophorese kann eine Signal-„Spitze“ in Form eines Peaks mit einer Breite von nahezu Null auftreten, der sich über alle Farbkanaäle erstreckt. Solche Spitzen werden bei der Identifizierung von Allelen von den meisten Fragmentanalyse-Softwares erkannt und ignoriert.

6.3 Anforderungen an die Qualitätskontrolle für die Dateninterpretation

Die Kenntnis der Qualität der OncoMate® MSI Dx Analysis System-Daten ist entscheidend für die korrekte Interpretation des Patienten-MSI-Status. Es muss ein Set von Assaykontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) vorhanden sein, um die Zuverlässigkeit der mit diesem Assay gewonnenen und für die MSI-Interpretation verwendeten Daten zu gewährleisten (Abschnitt 7). Bevor der MSI-Status einer Probe bestimmt wird, werden eine Reihe von Datenqualitätsprüfungen (QC) durchgeführt, um dem Benutzer die Zuverlässigkeit der Datenqualität zu bestätigen (Tabelle 5). Bei den meisten der im Folgenden beschriebenen QC-Prüfungen ist eine visuelle Überprüfung der Proben-Elektropherogramme erforderlich. Es reicht nicht aus, nur die Alleltabelle einer bestimmten Probencharge zu beurteilen, um die Datenqualität zu gewährleisten.

Die bei den QC-Prüfungen ausgewerteten Probentypen und die Auswirkungen einer nicht bestandenen QC-Prüfung sind in Tabelle 5 aufgeführt. Nach einer Daten-QC-Auswertung weisen die Patientenproben entweder den Status „Ungültig“ auf, was bedeutet, dass eine MSI-Interpretation aufgrund eines kritischen Daten-QC-Fehlers nicht möglich ist, oder den Status „Gültig“, was bedeutet, dass kein kritischer QC-Fehler erkannt wurde oder dass trotz eines QC-Fehlers eine Interpretation des Patienten-MSI-Status basierend auf den in Abschnitt 6.5.3 gegebenen Anleitungen möglich sein könnte. Wenn eine Kontrollprobe bestimmte Daten-QC-Prüfungen nicht besteht, kann die Qualität aller zugehörigen Patientenproben beeinträchtigt sein, und das Ergebnis „Ungültig“ gilt für alle Proben in der Charge. Wenn die Positiv- und Negativkontrollen alle QC-Tests bestanden haben, kann eine Patientenprobe die Daten-QC-Tests auf Probe-für-Probe-Basis bestehen oder nicht bestehen. Der Patientenprobenstatus, der einem nicht bestandenen QC zugeordnet wird, basiert darauf, ob das Nichtbestehen bei einer Positiv- oder Negativ-Amplifikationskontrolle oder bei der Patientenprobe aufgetreten ist. Proben, die die QC-Anforderungen nicht erfüllen, können gemäß den Anleitungen im Abschnitt Fehlerbehebung in diesem technischen Handbuch behandelt werden. Im Folgenden sehen Sie den empfohlenen Ablauf der Datenqualitätsprüfung:

1. Bewertung der Sizing Quality aller Kontroll- und Patientenproben
2. Bewertung von Chargenkontrollen (d. h. der Positiv- und Negativ-Amplifikationskontrollen)
3. Bewertung der Patientenproben

Tabelle 5. Daten-QC-Tests, die vor der MSI-Interpretation durchgeführt werden müssen, um die Qualität der OncoMate® MSI Dx Analysis System-Daten zu kennen.

				Status der Patientenprobe, wenn entweder eine Kontrollprobe oder eine Patientenprobe den entsprechenden QC-Test nicht besteht	
Abschnitt	QC-Test	Beschreibung des QC-Tests	Bewertete Proben¹	Kontrollprobe QC nicht bestanden²	Patientenprobe QC nicht bestanden³
6.3.1	QC Sizing-Qualität	Anhand der Peakform, der Größenübereinstimmung und der Size-Calling-Kurve wird ein Qualitätsscore berechnet.	+, -, N, T	Alle Proben ungültig	Probe ungültig
6.3.2	QC Negativkontrolle	Bei der Amplifikations-Negativkontrolle dürfen keine Peaks über dem analytischen Schwellenwert nachgewiesen werden.	-	Alle Proben ungültig	Patientenproben nicht evaluiert
6.3.3	QC Positivkontroll-Identität	Bei der Amplifikations-Positivkontrolle müssen die in den Pentanukleotid-Markern vorhandenen Allele den erwarteten Allelen für die 2800M Control DNA bis auf 1,5 Basenpaare genau entsprechen.	+	Alle Proben ungültig	Patientenproben nicht evaluiert
6.3.4	QC Off-scale-Peak	Die Intensität (RFU) der Peaks einer vorhandenen Probe darf den maximal nachweisbaren Bereich des Kapillarelektrophorese-Geräts nicht überschreiten.	+, N, T	Alle Proben ungültig	Probe ungültig
6.3.5	QC Spektrales Pull-up	Peaks, die in separaten Farbkanälen nach Länge ausgerichtet sind, werden für das spektrale Pull-up evaluiert (d. h. Signal-Bleed-through zwischen Farbkanälen).	+, N, T	Alle Proben ungültig	Probe ungültig
6.3.6	QC Breiter Peak	Die Breite der Peaks darf den für die MSI-Analyse festgelegten Wert nicht überschreiben.	+, N, T	Siehe Fußnote 4	Siehe Fußnote 4

Die Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

				Status der Patientenprobe, wenn entweder eine Kontrollprobe oder eine Patientenprobe den entsprechenden QC-Test nicht besteht	
Abschnitt	QC-Test	Beschreibung des QC-Tests	Bewertete Proben¹	Kontrollprobe QC nicht bestanden²	Patientenprobe QC nicht bestanden³
6.3.7	QC Allel amplifikation	In jedem Marker sollte mindestens ein Allel über dem analytischen Schwellenwert vorhanden sein.	+, N, T	Alle Proben ungültig	Marker ungültig; Probe kann ausgewertet werden
6.3.8	QC DNA-Kontamination	Für jeden Pentanukleotid-Marker dürfen maximal zwei Allele in der normalen Probe enthalten sein.	+, N	Alle Proben ungültig	Probe ungültig
6.3.9	QC Patientenproben-Identität	Bei jedem Pentanukleotid-Marker müssen die in der normalen Probe bestimmten Allele in der Tumorprobe vorhanden sein (auf bis zu 1,5 Basenpaare genau).	T	Kontrollen nicht evaluiert	Siehe Fußnote 5
6.3.10	QC Tumorsignal	Für Mononukleotid-Marker, die in der Tumorprobe als stabil bestimmt wurden, müssen die Allel-Peak-Höhen in der Tumorprobe ausreichend hoch sein, um die Assay-Empfindlichkeit sicherzustellen. Die erforderliche Peak-Intensität basiert auf dem analytischen Schwellenwert und dem Tumorgehalt der Probe.	T	Kontrollen nicht evaluiert	Marker ungültig; Probe kann ausgewertet werden

¹ N, normale Probe; T, Tumorprobe; +, Positivkontrolle; –, Negativkontrolle

² MSI-Auswertungsergebnis für alle Patientenproben der Charge, wenn eine Kontrollprobe das zugehörige QC-Problem zeigt.

³ Spalte zeigt an, ob Patientenproben ungültig oder noch auswertbar sind, wenn sie trotz des Fehlers für einen bestimmten Marker vom zugehörigen QC-Problem betroffen sind. Die bereitgestellte Anweisung weist darauf hin, dass Kontrollproben alle QC-Tests bestehen müssen. Siehe die Auswertungsrichtlinien in Abschnitt 6.5.

⁴ Erkennen Sie das bekannte Artefakt mit breiten Peaks zwischen 83 bp und 90 bp in NR-21 während der QC-Evaluierung der Daten als nicht mit der Instabilität in Verbindung stehend an. Alle Proben sollten als ungültig eingestuft werden, wenn eine Kontrollprobe einen anderen breiten Peak als das bekannte Artefakt NR-21 zeigt. Die betroffenen Marker sollten als ungültig betrachtet werden, wenn ein anderer breiter Peak als das bekannte Artefakt NR-21 in einer Patientenprobe beobachtet wird.

⁵ Wenn die QC der Patientenproben-Identität aufgrund eines nicht vorhandenen Allels fehlschlägt, kann die Probe gemäß den Hinweisen in Abschnitt 6.5.3 auswertbar sein. Andernfalls ist die Probe ungültig.

6.3.1 Evaluierung aller Proben auf die Sizing Quality (QC Sizing Quality)

Messgrößen für die Sizing-Qualität können mithilfe von Kapillarelektrophorese-Geräten ermittelt und/oder in der Fragment-Analysesoftware angezeigt werden. Probleme in Verbindung mit der Sizing-Qualität stehen häufig mit einem Fehler bei der Kapillarelektrophorese-Analyse in Zusammenhang und treten auf Grundlage einzelner Kapillaren auf (d. h. nicht bei jeder Kapillare einer Injektion). Proben, die Probleme bei der Sizing Quality aufweisen, zeigen keine (oder nur wenige) Fragment-Peaks oder Fragment-Peaks, die sich mit zunehmender Größe verbreitern (d. h. bei denen die Auflösung verloren geht) (Abbildung 9). Evaluieren Sie die Sizing-Qualität für jede analysierte Probe und Kontrolle, da die Sizing-Informationen entscheidend für das Testergebnis sind.

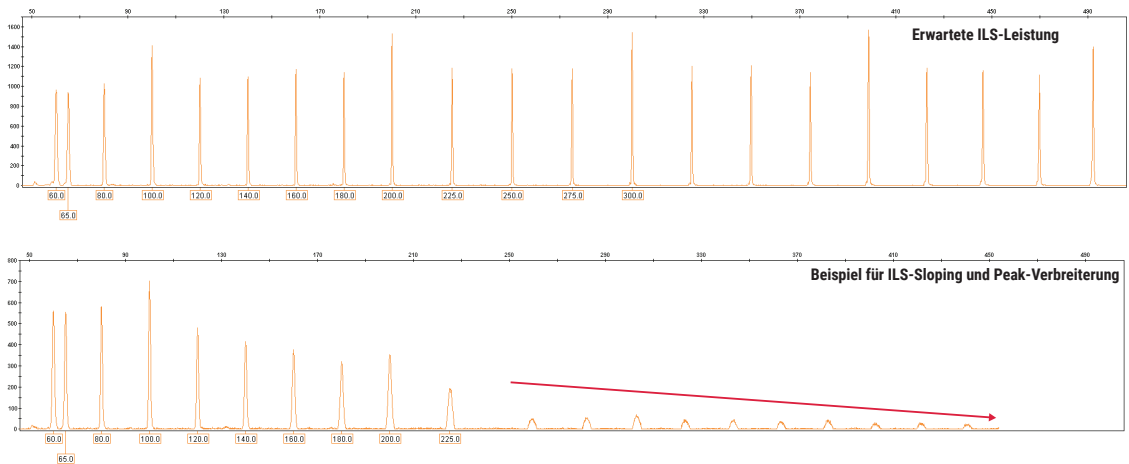
Um die Sizing-Qualität zu beurteilen muss sichergestellt werden, dass der Farbkanal des Size Standard 500 (orange) in der Fragment-Analysesoftware angezeigt wird und die für die Segmente mit dem Größenstandard 60 bp bis 300 bp erwarteten Peak-Profile aufweist. Das Ergebnis einer Patienten- oder Kontrollprobe ist ungültig, wenn eines der folgenden Merkmale für mangelhafte Sizing-Qualität bestimmt wird:

- a. Eine Sizing-Qualitäts-Markierung wurde von der Datensammlung des Kapillarelektrophorese-Systems oder der Fragment-Analysesoftware ausgegeben.

Hinweis: Nur die Fragmente des Size Standard 500 von 60 bp bis 300 bp werden für das Sizing von MSI-Markern verwendet. Offensichtliche Qualitätsprobleme für Peaks des Size Standard 500 über 300 bp beeinträchtigen das Fragment-Sizing nicht.

- b. Mindestens eines der 13 Size Standard 500-Fragmente von 60 bp bis 300 bp sind nicht markiert oder falsch markiert (60 bp, 65 bp, 80 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp und 300 bp). Dies kann aufgrund von schwerem Peak-zu-Peak-Sloping oder einer starken Peak-Verbreiterung innerhalb des Größenstandards auftreten. Gelegentlich können bei der Kapillarelektrophorese abweichende Peaks erkannt werden, die zu einer Fehlauswertung des Größenstandards führen können.

Hinweis: Zacken bei der Kapillarelektrophorese (d. h. Peaks ohne Breite) können zwar vorhanden sein, interferieren jedoch nicht mit dem Fragment-Sizing, sofern sie nicht von der Fragment-Analysesoftware fälschlicherweise als Größenstandard-Peaks markiert werden.



16185TA

Abbildung 9. Die obere Abbildung zeigt das für den Size Standard 500 erwartete Ergebnis an. Die untere zeigt extremes Sloping und eine starke Peak-Verbreiterung an, was auf ein Sizing-Qualitäts-Problem hinweist.

6.3.2 Evaluierung der Negativkontroll-Reaktion auf die Amplifikation (QC Negativkontrolle)

Neben den Patientenproben muss eine Amplifikations-Negativkontrolle analysiert werden. Fragment-Peaks, die in den Farbkanälen (blau, grün und gelb/schwarz) der Proben über dem analytischen Schwellenwert für die Amplifikations-Negativkontrolle nachgewiesen werden, weisen auf eine möglicherweise erfolgte Kontamination hin. Eine kontaminierte Negativkontrolle würde auf potenzielle Probleme bei der Datenqualität bei der gesamten Probencharge hinweisen. Daher sind alle Patientenproben einer Charge mit fehlgeschlagenen Kontrollproben als ungültig zu betrachten.

6.3.3 Evaluierung der Pentanukleotid-Repeat-Marker auf die Positivkontroll-Reaktion für die Identität (QC Positivkontroll-Identität)

Eine Amplifikations-Positivkontroll-Probe, die mit 2800M Control DNA hergestellt wurde, muss zusätzlich zu den Patientenproben analysiert werden, um einen Nachweis für die Assay-Integrität zu liefern (d. h., dass die erwarteten Ergebnisse beobachtet wurden). Die QC der Positivkontroll-Identität wird mithilfe von Penta D- und Penta C-Markern evaluiert. Die Amplifikations-Positivkontrollprobe zeigt zwei Allele an jedem Pentanukleotid-Repeat-Marker, die basierend auf unseren Leistungsevaluierungsdaten innerhalb der folgenden Größenbereiche (bp) nachgewiesen werden (in Anhängen B und C aufgeführte Bedingungen):

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

Eine Positivkontrolle, die diese Kriterien nicht erfüllt, weist auf potenzielle Probleme bei der Datenqualität der gesamten Probencharge hin. Daher sind alle analysierten Patientenproben einer Charge mit fehlgeschlagenen Positivkontroll-Proben als ungültig zu betrachten.

6.3.4 Evaluierung von Peak-Intensitäten auf Off-scale-Ergebnisse (QC Off-scale Peak)

Kapillarelektrophorese-Geräte können fluoreszente Signale von farbmarkierten DNA-Fragmenten nur eingeschränkt nachweisen. In einigen Situationen kann das fluoreszente Signal von OncoMate® MSI Dx Analysis System-Amplifikationsprodukten die obere Grenze des Detektors überschreiten. In diesem Fall wird die QC-Markierung auf dem Off-scale-Peak vom Gerät ausgegeben und in der Fragment-Analysesoftware angezeigt. Off-scale-Peak-Intensitäten können zu Signal-Bleed-through auf anderen Farbkanälen führen (Abbildung 10, Abschnitt 6.3.5). Da die Bleed-through-Muster denen des ursprünglichen Signalmusters entsprechen, kann dieses Bleed-through mit einem Allel einer normalen oder Tumorseite verwechselt werden, was die MSI-Auswertung verkompliziert. Eine Patienten- oder Kontrollprobe sollte als ungültig eingestuft werden, wenn Off-scale-Ergebnisse beobachtet werden. Für 2800M Amplifikations-Positivkontrollen beobachtete Off-scale-Ergebnisse weisen auf einen systematischen Fehler bei der Herstellung oder Amplifikation von OncoMate® MSI Dx Analysis System-Reaktionen und auf mögliche Datenqualitätsprobleme der gesamten getesteten Probencharge hin. Chargen, bei denen eine Positivkontrolle die QC der Off-scale-Peaks nicht besteht, müssen alle Proben in der Charge als ungültig betrachtet und gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden. Evaluieren Sie Daten für Off-scale-Ergebnisse in jeder analysierten Probe und der 2800M-Amplifikationskontrolle.

6.3.5 Evaluierung aller Marker auf spektrales Pull-up (QC Spektrales Pull-up)

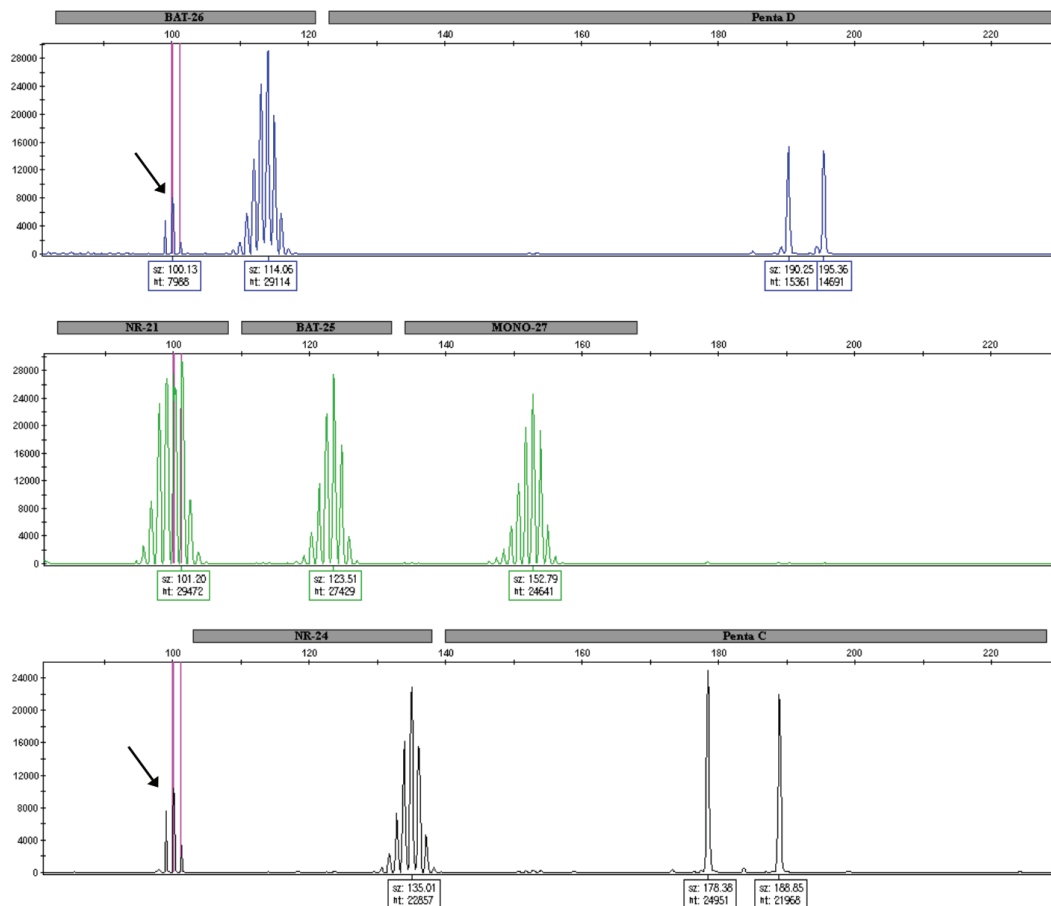
Wenn Off-scale-Ergebnisse beobachtet werden oder die spektrale Kalibrierung des Kapillarelektrophorese-Geräts mangelhaft ist (z. B. aufgrund von Veränderungen an der Geräteoptik während eines Services), können Fluoreszenzsignale von farbstoffmarkierten Fragmenten außerhalb des vorgesehenen Farbkanals erkannt werden, die ungefähr die gleiche Größe (bp) wie das wirkliche Signal haben. Diese Situation wird als spektrales Pull-up oder Bleed-through bezeichnet. Wenn auf anderen Farbkanälen Bleed-through erkannt wird, kann von der Fragment-Analysesoftware unter Umständen eine QC-Markierung angezeigt werden.

Siehe das Technische Handbuch zur ausgewählten Fragment-Analysesoftware zu den Einstellungsparametern für den Nachweis von spektralen Pull-ups. Parameter, die jenen entsprechen, die bei der Evaluierung des OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendet wurden, finden Sie in Anhang C.

Da die Peak-Muster denen des ursprünglichen Signalmusters entsprechen, kann dieses Bleed through mit einem Allel einer normalen oder Tumorprobe verwechselt werden, was die MSI-Auswertung verkompliziert. Bleed-through-Signale, die in zu 2800M-Amplifikations-Positivkontrollen vorhanden sind, können auf potenzielle Datenqualitäts-Probleme bei der gesamten Probencharge des Assays hinweisen. Aus diesem Grund sollten betroffene Patienten- oder Kontrollproben als ungültig betrachtet werden, wenn ein Bleed-through über dem analytischen Schwellenwert beobachtet wird. Evaluieren Sie Daten auf Bleed-through in jeder analysierten Probe und der Amplifikations-Positivkontrolle. Um Proben auf Bleed-through-Peaks zu bewerten, müssen alle Farbkanäle auf dem gleichen Diagramm angezeigt werden (Abbildung 10). Halten Sie nach Peaks der gleichen Größe Ausschau, die mindestens in zwei Farbkanälen vorhanden sind. Echte Peaks eines Farbkanals haben eine erheblich höhere Intensität als Bleed-through-Peaks auf den anderen Farbkanälen. Bei OncoMate® MSI Dx Analysis System-Fragmenten kann Bleed-through bei den folgenden Mustern beobachtet werden:

- a. BAT-26-Peaks können in den Panels NR-21 oder BAT-25 beobachtet werden
- b. Penta D-Peaks können in den Panels BAT-25 oder MONO-27 beobachtet werden
- c. NR-21-Peaks können in den Panels BAT-26 oder NR-24 beobachtet werden
- d. BAT-25-Peaks können in den Panels BAT-26, Penta D oder NR-24 beobachtet werden
- e. MONO-27-Peaks können in den Panels Penta D, NR-24 oder Penta C beobachtet werden
- f. NR-24-Peaks können in den Panels NR-21, BAT-25 oder MONO-27 beobachtet werden
- g. Penta C-Peaks können im Panel MONO-27 beobachtet werden

In manchen Situationen können echte Fragment-Peaks über Farbkanäle hinweg ausgerichtet und für Bleed-through gehalten werden. Wiederholen Sie in diesen Fällen die spektrale Kalibrierung des Kapillarelektrophorese-Geräts und den Assay, um die Zuverlässigkeit der Daten und der darauffolgenden MSI-Auswertung zu gewährleisten.



16186TA

Abbildung 10. Normale Off-scale-Gewebeprobe, mit hervorstechendem Signal-Bleed-through zwischen Farbkanälen.

Peaks in NR-21 überschritten die Nachweisgrenze des Kapillarelektrophorese-Geräts, was zu einer Off-scale-Markierung und einem Bleed-through-Peak mit einem ähnlichen Muster bei anderen Markern führte. **Panel A.** Marker im blauen Farbkanal, die eine Gruppe von Signal-Bleed-through-Peaks von NR-21 nach BAT-26 zeigen. **Panel B.** Marker im grünen Farbkanal, die Off-scale-Peaks für NR-21 hervorheben. **Panel C.** Marker im gelben/schwarzen Farbkanal; die Bleed-through-Peaks von NR-21 in diesen Farbkanal befinden sich außerhalb der Marker-Panel.

6.3.6 Evaluierung aller Marker auf breite Peaks (QC Breiter Peak)

Breite Fragment-Peaks können beobachtet werden und als Allele in OncoMate® MSI Dx Analysis System-Daten ausgegeben werden. Diese Peaks zeigen ein Muster mit einem leichten Anstieg und Gefälle, das sich über mehrere Basenpaare erstreckt und das sich leicht von echten Fragment-Peaks unterscheidet, die über eine Spanne von 1 bp bis 2 bp steil ansteigen und abfallen. Breite Peaks können infolge abweichender PCR-Amplifikation oder Kapillarelektrophorese sporadisch beobachtet werden. Ein bekanntes Artefakt bei der Amplifikation breiter Peaks wird häufig zwischen 83 bp und 90 bp im OncoMate® MSI Dx Analysis System NR-21-Marker beobachtet (siehe Abschnitt 6.2 für mehr Details). Wenn breite Peaks erkannt werden, wird von der Fragment-Analysesoftware unter Umständen eine QC-Markierung angezeigt.

Siehe das Technische Handbuch zur ausgewählten Fragment-Analysesoftware zu den Einstellungsparametern für den Nachweis spektraler Pull-ups. Parameter, die jenen entsprechen, die bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendet wurden, finden Sie in Anhang C (Abschnitt 11.3).

Überprüfen Sie Patienten- und Kontrollproben bei jedem Marker auf breite Peaks, die als Allele ausgegeben wurden. Ein breiter Peak bei NR-21 zwischen 83 bp und 90 bp steht nicht mit der Mikrosatelliten-Instabilität in Zusammenhang und sein Nachweis weist nicht auf eine fehlgeschlagene QC der breiten Peaks hin. Wenn für einen oder mehrere Marker ein breiter Peak beobachtet wird, ist die Qualität der Daten herabgesetzt. Die Daten nicht betroffener Marker können unter Umständen trotzdem ausgewertet werden, siehe dazu Abschnitt 6.5. Breite Peaks in Kontrollproben können auf potenzielle Probleme bei der Datenqualität bei der gesamten Probencharge hinweisen. In Chargen, bei denen eine Positivkontrolle die QC der breiten Peaks nicht besteht, müssen alle Proben in der Charge als ungültig betrachtet und gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden.

6.3.7 Evaluierung aller Marker auf Allel amplifikation (QC Allel amplifikation)

Überprüfen Sie Patientenproben und 2800M Positivkontrollen bei jedem Marker, um herauszufinden, ob ein echter Fragment-Peak über dem analytischen Schwellenwert vorhanden ist (siehe Abschnitte 3.9 und 7.5). Wenn für einen oder mehrere Marker kein Allel beobachtet wird, ist die Qualität der Daten herabgesetzt. Dokumentieren Sie Marker, für die die QC der Allel amplifikation fehlschlägt. Die Daten nicht betroffener Marker können unter Umständen trotzdem ausgewertet werden, siehe dazu Abschnitt 6.3. **Hinweis:** Für einen vorgegebenen Mononukleotid-Repeat-Marker muss sowohl in der normalen als auch in der Tumorprobe mindestens ein Allel nachgewiesen werden, um ausgewertet werden zu können. Fehlende Allele, die in 2800M-Amplifikations-Positivkontrollen vorhanden sind, können auf potenzielle Datenqualitätsprobleme bei der gesamten Probencharge des Assays hinweisen. In Chargen, bei denen eine Positivkontrolle die QC der Allel amplifikation nicht besteht, müssen alle Proben in der Charge als ungültig betrachtet und gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden.

6.3.8 Evaluierung der Amplifikations-Positivkontrolle und der normalen Patientenproben auf DNA-Kontamination (QC DNA-Kontamination)

Eine Analyse der Anzahl von Allelen, die in den Pentanukleotid-Repeat-Markern nachgewiesen wurden, kann manchmal Informationen zur Probenkontamination aus externen Quellen der humanen DNA liefern. Zählen Sie die Anzahl von Allelen, die für jeden Pentanukleotid-Repeat-Marker in der Amplifikations-Positivkontrolle und in den normalen Patientenproben bestimmt wurde. Die QC der DNA-Kontamination schlägt fehl, wenn drei oder mehr Allele für Penta C oder Penta D ermittelt werden. Genomische Instabilität in Zusammenhang mit bestimmten Tumoren kann dazu führen, dass zwei oder mehr Allele in der Tumorprobe vorhanden sind. Daher ist eine Evaluierung von Tumorproben von Patienten durch die QC DNA-Kontamination ohne Aussagekraft. Fehlschläge bei 2800M-Amplifikations-Positivkontrollen können auf potenzielle Datenqualitäts-Probleme bei der gesamten Assay-Probencharge hinweisen. In Chargen, bei denen eine Positivkontrolle die QC DNA-Kontamination nicht besteht, müssen alle Proben in der Charge als ungültig betrachtet und gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden. Normalproben des Patienten, bei denen die QC DNA-Kontamination fehlschlägt, müssen gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 als ungültig eingestuft und behandelt werden.

6.3.9 Evaluierung von Pentanukleotid-Repeat-Markern in Patientenproben auf Identität (QC Patientenproben-Identität)

Vergleichen Sie Allele in jedem Pentanukleotid-Repeat-Marker, um Zuverlässigkeit dahingehend zu schaffen, dass normale und Tumorproben vom gleichen Patienten stammen. Die QC der Patientenproben-Identität ist bestanden, wenn alle in der normalen Probe bestimmten Allele auch in der Tumorprobe vorhanden sind. Mit bestimmten Tumoren in Verbindung stehende genomische Instabilität kann dazu führen, dass im Vergleich zur normalen Probe mehr oder weniger Allele in der Tumorprobe vorhanden sind. Es wurde das Vorhandensein von zusätzlichen Allelen in der Tumorprobe beobachtet und führt nicht zum Fehlschlagen der QC der Patientenproben-Identität. Zusätzliche Allele in der Tumorprobe bei den Penta-Markern weist nicht auf eine MSI hin. Andererseits kann ein fehlendes Allel in der Tumorprobe auf einen Probentausch oder den Verlust der Heterozygotie (LOH) am Marker hinweisen (siehe Abschnitt 6.5.3). Probenpaare, bei denen die QC der Patientenproben-Identität aufgrund eines fehlenden Allels in der Tumorprobe fehlschlägt, können dennoch ausgewertet werden, siehe dazu die Hinweise in Abschnitt 6.5.3. Probenpaare, bei denen die QC der Patientenproben-Identität aus anderen Gründen fehlschlägt, müssen als ungültig betrachtet und gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden. Positiv- und Negativkontrollen werden nicht auf die QC der Patientenproben-Identität evaluiert.

6.3.10 Evaluierung von Mononukleotid-Repeat Markern in Tumorproben auf Signal (QC Tumorsignal)

Für jeden Mononukleotid-Marker wird der Marker als stabil bewertet, wenn im Vergleich zur normalen Probe keine neuen Allele in der Tumorprobe identifiziert werden. Das normale (Referenz-)Allel in der Tumorprobe muss jedoch bei einer ausreichenden Intensität vorhanden sein, und zwar basierend auf dem Probentumorgehalt, um sicherzustellen, dass neue Allele, die über der analytischen Schwellenwert liegen, nachgewiesen werden. Daher muss jede Peak-Intensität an jedem offensichtlich stabilen Mononukleotid-Repeat-Marker überprüft werden, um zu bestimmen, ob die Allelintensität ausreicht, um die Empfindlichkeit für den Nachweis neuer Allele zu bestimmen.

Zur Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System haben wir den analytischen Schwellenwert als 175 RFU mit einem Mindesttumorgehalt von 20 % bestimmt, was einem Tumorgehalt von 0,2 entspricht. Um die Assay-Empfindlichkeit sicherzustellen, haben wir bei der Berechnung die folgende Formel für die Berechnung einer mindestens erforderlichen normal-Allel Peak-Intensität von 700 RFU bei offensichtlich stabilen Mononukleotid-Repeat-Markern in Tumorproben verwendet:

$$\text{Tumorsignaltintensität (RFU)} \geq \text{Analytischer Schwellenwert} \times \frac{1}{\text{Mindest-Tumorfraction}} \times (1 - \text{Mindesttumorfraction})$$

Bei einer Mindest-Peak-Intensität von 700 RFU würde ein bei 20 % (Tumorgehalt von 0,2) vorhandenes neues Allel (d. h. 175 RFU sind 20 % des Gesamtsignals von 875 RFU, während 700 RFU 80 % des Gesamtsignals von 875 RFU sind) eine erwartete Peak-Höhe von 175 RFU haben. Daher ist die Sicherstellung der Signalintensität ausreichend, um bei einer stabilen Auswertung Zuverlässigkeit für einen vorgegebenen Marker in Proben mit ≥ 20 % Tumorgehalt zu erzielen. Dokumentieren Sie Marker, bei denen die QC zum Tumorsignal fehlschlägt. Die Daten nicht betroffener Marker können unter Umständen trotzdem ausgewertet werden, siehe dazu Abschnitt 6.5. Positiv- und Negativkontrollen werden nicht auf die QC zum Tumorsignal evaluiert.

6.4 Bestimmung der Stabilität von Mononukleotid-Repeat-Markern

Die Analyse der Mononukleotid-Repeat-Marker in gepaarten normalen und Tumorproben bestimmt die Stabilität der Marker, was den MSI-Status des Tumors zeigt. Die Stabilität wird auf einer Marker-nach-Marker-Basis evaluiert und die Instabilität wird durch die Anwesenheit einer oder mehrerer Mikrosatelliten-Allele in der Tumorprobe im Vergleich zur normalen Probe des gleichen Patienten bestimmt. Bei einigen Tumoren können subtile Allel-Änderungen vorhanden sein und sich davon unterscheidende neue Allele können unter Umständen nicht durch die neue Analysesoftware bestimmt werden. Für solche Proben kann eine Instabilität bestimmt werden durch einen visuellen Vergleich von Elektropherogrammen auf Unterschiede. Bei anderen Tumoren, wie z. B. jenen von CRC-Patienten mit MSI-High, können deutliche Änderungen der Mikrosatellit-Profile vorliegen und verschiedene neue Allele mit flankierenden Stutter-Peaks abnehmender Intensität vorhanden sein. Die wiederholte Analyse einer Probe mit erhöhtem Tumorgehalt und/oder mit unterschiedlichen Kapillarelektrophorese-Injektionszeiten kann informativ sein, wenn die Markerstabilität gleich oder unbestimmt ist (Guedes, 2017; Wang, 2017; Boyle, 2014). Das Verfahren für die Bestimmung der Markerstabilität ist in Abbildung 11 zusammengefasst. Tabelle 6 fasst die möglichen Ergebnisse bei der Bestimmung der Stabilität der Mononukleotid-Repeat-Marker zusammen. Bei Patientenproben, die aufgrund eines QC-Fehlers von kritischen Daten als ungültig erachtet wurden, kann die Marker-Stabilität nicht bestimmt werden (Abschnitt 6.3).

Während der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System haben wir bei der Bestimmung der Markerstabilität einen einfachen Algorithmus angewendet: Bei jedem der fünf Mononukleotid-Repeat-Marker in der normalen und in der Tumorprobe, wurde für nachfolgende Vergleiche das kleinste Allel als Allel von Interesse betrachtet. Die Größendifferenz zwischen den Allelen von Interesse in den normalen und Tumorproben wurde berechnet, um die Markerstabilität zu bestimmen. Wenn diese Differenz 3 bp (in der Praxis als $\geq 2,75$ bp umgesetzt, um die Größengenauigkeit des Kapillarelektrophorese-Geräts zu berechnen), wurde der Marker als instabil gewertet.

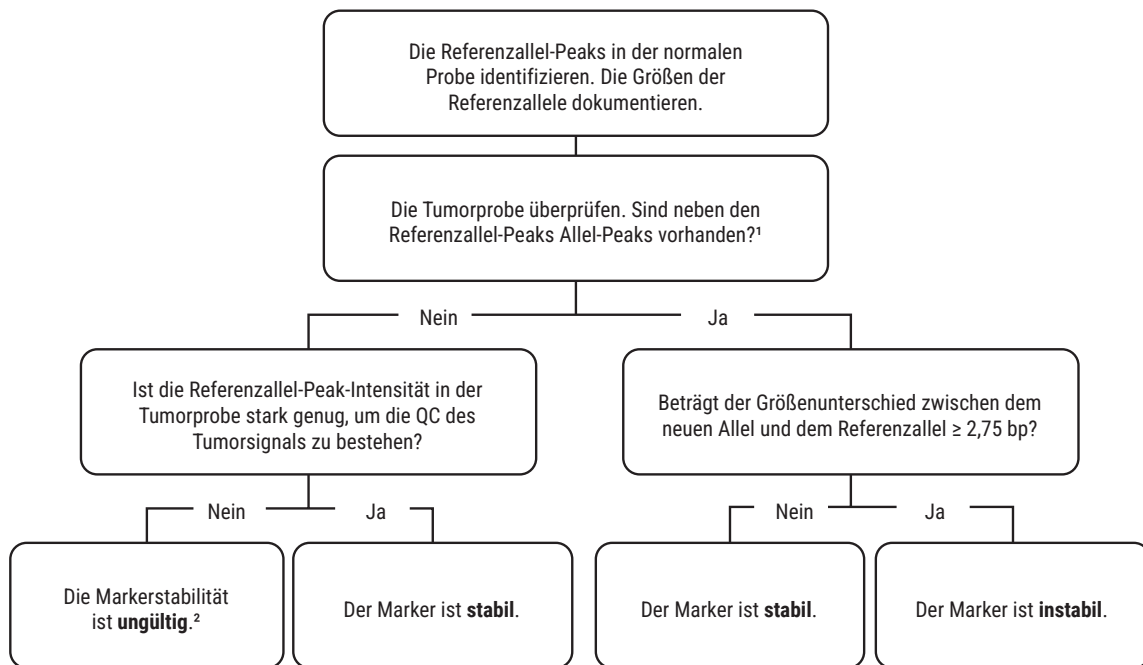
Tabelle 6. Mononukleotid-Repeat-Markerstabilitäts-Calls ermittelt durch Vergleich von in normalen und Tumorproben vorhandenen Allelen.

Markerstabilitäts-Call

Der jedem Marker der Probe zugewiesene Stabilitäts-Call

Wert	Beschreibung
Stabil	Beim Mononukleotid-Repeat-Marker wurde keine Mikrosatelliten-Instabilität erkannt. In der Tumorprobe wurden keine neuen Allele erkannt oder der Größenunterschied zwischen einem neuen Tumorallel und dem normalen Referenzallel war insignifikant ($< 2,75$ bp).
Instabil	Beim Mononukleotid-Repeat-Marker wurde eine Mikrosatelliten-Instabilität erkannt. In der Tumorprobe wurde ein neues Allel erkannt, und der Größenunterschied zwischen diesem Allel und dem normalen Referenzallel war signifikant ($\geq 2,75$ bp).
Ungültig	Der Mononukleotid-Repeat-Marker konnte nicht auf Mikrosatelliten-Instabilität überprüft werden. Die Probandatenqualität war aufgrund eines kritischen QC-Fehlers nicht akzeptabel (siehe Abschnitt 6.3).

Für jeden Mononukleotid-Repeat-Marker, der die QC besteht, müssen Sie:



1. Tumorproben bestehen oft aus einer Mischung aus normalen und Tumorzellen; das Vorhandensein eines normalen Referenz-Allels in der Tumorprobe ist normal.
2. Weitere Informationen siehe Abschnitt 9 „Fehlerbehebung“.

Abbildung 11. Allgemeine Hinweise für die Bewertung der Stabilität von Mononukleotid-Repeat-Markern bei Patientenproben. Folgen Sie dem Ablaufdiagramm jeden Mononukleotid-Repeat-Markers, der die in Abschnitt 6.3 beschriebenen QC-Datenanforderungen erfüllt hat. Dokumentieren Sie die Stabilität jeden Markers und fahren Sie anschließend mit Abschnitt 6.5 „Auswertung des MSI-Status des Tumors“ fort. **Hinweis:** Um einen vorgegebenen Mononukleotid-Repeat-Marker auswerten zu können, müssen für diesen Marker die QC-Überprüfungen in allen normalen und Tumorproben bestanden werden.

6.5 Auswertung des MSI-Status des Tumors

6.5.1 Zusammenfassung

Das Verfahren zur Auswertung des MSI-Probenstatus, der auf den Stabilitäts-Calls beruht, die für die OncoMate® MSI Dx Analysis System-Marker bestimmt werden, ist in Abbildung 12 zusammengefasst. Tabelle 7 fasst die Endpunkte für die Auswertung des MSI-Status von Tumorproben zusammen. Diese Methode folgt den Konsensregeln für die Bestimmung des MSI-Status von Proben, die im Rahmen des „US National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability“ (Boland, 1998) erstellt wurden. Wenn keine kritischen QC-Fehler beobachtet werden, wird der MSI-Status wie folgt bewertet:

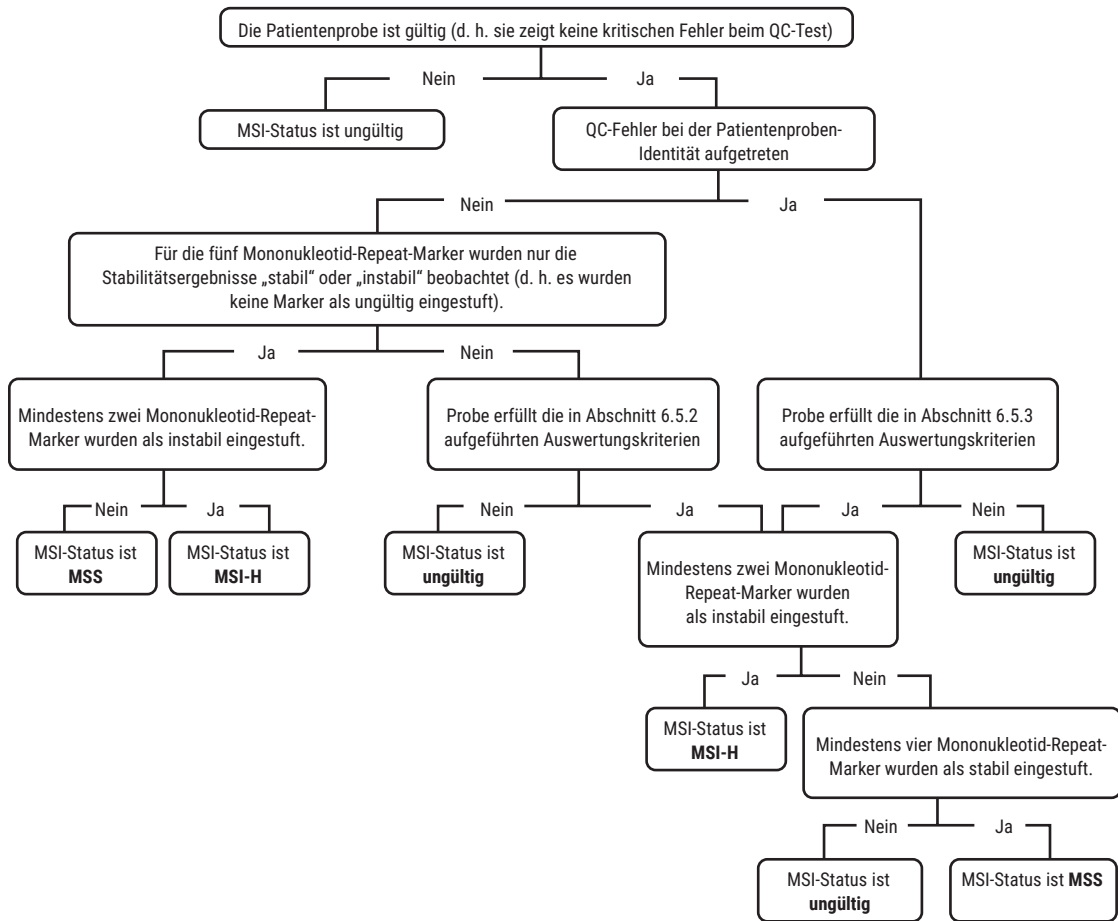
Eine Tumorprobe wird als MSI-H eingestuft, wenn mindestens zwei Mononukleotid-Repeat-Marker instabil sind. Eine Tumorprobe wird als MSS eingestuft, wenn weniger als zwei Mononukleotid-Repeat-Marker als instabil eingestuft werden (Boland, 1998; Hampel, 2008; Umar, 2004).

Eine MSI-Bestimmung ist auch dann immer noch möglich, wenn ungültige Ergebnisse für eine Untergruppe von Markern ermittelt werden (siehe Abschnitt 6.5.2) oder wenn eine fehlgeschlagene QC der Patientenproben-Identität beobachtet wird (siehe Abschnitt 6.5.3). Hinweise zur Auswertung solcher Proben finden Sie unten. Proben, die weniger als zwei gültige Mononukleotid-Repeat-Marker aufweisen, können nicht ausgewertet werden und müssen gemäß den Hinweisen in Abschnitt 9 behandelt werden.

Tabelle 7. MSI-Status des Tumors aus der Summe der Markerstabilitätsergebnisse ermittelt.

Wert	Beschreibung
MSS	MSS (Mikrosatellitenstabilität) weist darauf hin, dass weniger als zwei Mononukleotid-Repeat-Marker als instabil bestimmt wurden.
MSI-H	MSI-H (MSI Hoch) weist darauf hin, dass mindestens zwei Mononukleotid-Repeat-Marker als instabil bestimmt wurden.
Ungültig	Ungültig weist darauf hin, dass die Qualität der Probandaten aufgrund einer fehlgeschlagenen QC der kritischen Daten nicht akzeptabel ist (siehe Abschnitt 5). Anhand dieser Daten ist keine MSI-Auswertung möglich. Wenn die QC einer Charge aufgrund eines Problems mit der Amplifikations-Positiv- oder Negativkontrolle fehlgeschlagen ist, müssen alle Proben dieser Charge als ungültig eingestuft werden. Siehe den Abschnitt zur Fehlerbehebung in diesem Handbuch für Hinweise zur Behebung von QC-Fehlern, die zu ungültigen Ergebnissen führen.

Interpretation des MSI-Status jeder Patientenprobe:



16188MA

Abbildung 12. Allgemeine Hinweise zur Bestimmung des MSI-Status einer Tumorprobe. Folgen Sie dem Ablaufdiagramm für jede Probe, die die QC besteht.

6.5.2 MSI-Auswertung, wenn eine Untergruppe von Markern ungültige Stabilitätsergebnisse zeigt

Wenn Allel-Peak-Intensitäten für Mononukleotid-Repeat-Marker für die Datenevaluierung zu schwach sind, zeigen Proben Fehler bei der Tumorsignal-QC oder Allel amplifikations-QC und einen Markerstabilitätsstatus von ungültig. Wenn ein breiter Peak mit dem Allel-Peak-Sizing interferiert, zeigt eine Probe einen Fehler bei der QC zu breiten Peaks und den Markerstabilitätsstatus „ungültig“.

Die MSI-Auswertung einer Patientenprobe, die bei einer Untergruppe von Mononukleotid-Repeat-Markern ungültige Stabilitätsergebnisse zeigt, kann möglich sein, wenn folgende Bedingungen zutreffen:

1. Geringe Peak-Höhen können nicht durch a) Erhöhung des DNA-Inputs in die OncoMate® MSI Dx Analysis System-Amplifikationsreaktion oder b) erneute Analyse eines anderen FFPE-Gewebeschnitts korrigiert werden.
2. Bei keinem der beiden Pentanukleotid-Repeat-Marker wurden ein QC-Fehler beobachtet.
3. Die einzigen QC-Fehler sind die Tumorsignal-QC, die Allel amplifikations-QC oder die Breite Peak-QC.
4. Ein stabiler oder instabiler Call konnte für mindestens zwei Mononukleotid-Repeat-Marker erfolgen.

Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, kann die Probe mithilfe der folgenden Hinweise anhand der restlichen, gültigen Stabilitätsdaten ausgewertet werden (Boland, 1998):

1. Wenn mindestens zwei Mononukleotid-Repeat-Marker instabil sind, stufen Sie die Tumorprobe als MSI-H ein.
2. Wenn mindestens vier Mononukleotid-Repeat-Marker stabil sind, stufen Sie die Tumorprobe als MSS ein.
3. Andernfalls lässt sich die Probe nicht auswerten. Der MSI-Probenstatus wird ungültig sein.

6.5.3 MSI-Auswertung, wenn das Fehlschlagen der QC der Patientenproben-Identität beobachtet wird

Innerhalb von Tumorproben können Pentanukleotid-Marker Allele verlieren oder zusätzliche Allele anzeigen, die die Auswertung der Identität bei normalen Proben erschwert. Zu den bei Tumorgewebe beobachteten häufigen genetischen Ereignissen gehören der Verlust der Heterozygotie (LOH) und eine generalisierte genomische Instabilität, die mit der Probenauthentifizierung interferieren kann (d. h. Bestätigung der Identität bei übereinstimmenden normalen und Tumorproben). Pentanukleotid-Repeat-Marker können im Vergleich zur übereinstimmenden normalen Probe eine andere Allelanzahl in einer Tumorprobe zeigen. Das Vorhandensein zusätzlicher Allelen in einer Tumorprobe führt nicht zu einem QC-Datenfehler.

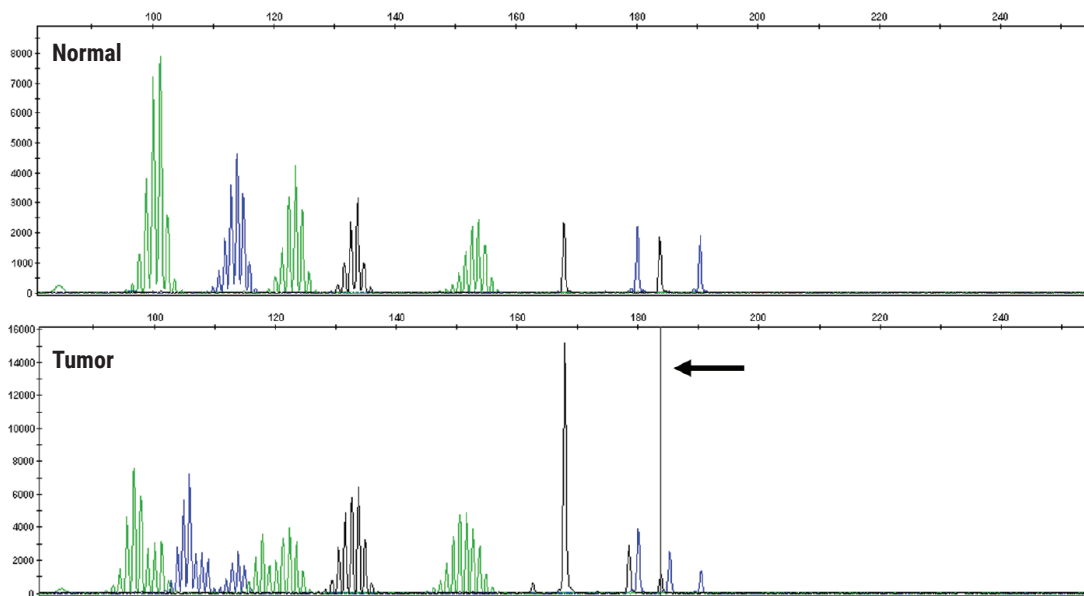
Andererseits können Fälle von ausgeprägtem Allel-Ungleichgewicht (z. B. Verlust der Heterozygotie, LOH) dazu führen, dass ein Pentanukleotid-Allel in einer normalen Probe vorhanden ist, aber in einer Tumorprobe nicht als Allel benannt wird. Ein schweres Allel-Ungleichgewicht wird beobachtet, wenn eines der normalen Pentanukleotid-Allele im Tumor verloren geht (d. h., wenn die Peak-Höhe stark verringert ist und das Allel nicht als solches erkannt wird). Dieser Status kann zu einem offensichtlichen Fehler bei der QC der Patientenproben-Identität führen. Um zu ermitteln, ob ein „verlorenes“ normales Allel über dem analytischen Schwellenwert vorhanden ist und einfach vom Allel-Benennungs-Algorithmus der Software ausgefiltert wurde, öffnen Sie die Probendatei in der Fragment-Analysesoftware und bewegen Sie den Cursor über dem „verlorenen“ Peak im Elektropherogramm für die Tumorprobe. Wenn Sie den Cursor über einem möglichen „verlorenen“ Peak in der GeneMapper® Software bewegen, wird eine schwarze vertikale Linie angezeigt, die darauf hinweist, dass der Peak über dem analytischen Schwellenwert liegt, jedoch ausgefiltert wurde und daher nicht als Allel bestimmt wurde (Abbildung 13). Alternativ können Sie einen möglichen „verlorenen“ Peak vergrößern, um sicherzustellen, dass er über dem analytischen Schwellenwert liegt. Wenn die ausgewählte Fragment-Analysesoftware diese Funktion nicht unterstützt, müssen Sie sicherstellen, dass die Peak-Höhe des verlorenen Allels den analytischen Schwellenwert übersteigt.

Eine MSI-Auswertung kann für eine Patientenprobe möglich sein, die einen offensichtlichen Fehler bei der QC der Patientenproben-Identität zeigt, wenn folgende Bedingungen zutreffen:

1. Der QC-Fehler wurde bei einem einzelnen Pentanukleotid-Repeat-Marker beobachtet (d. h. Penta C oder Penta D, nicht beide).
2. Das „verlorene“ normale Allel ist in der Tumorprobe über dem analytischen Schwellenwert vorhanden, wurde aber aufgrund der erheblich größeren Höhe des anderen Allels im gleichen Panel von dem Allel-Calling-Algorithmus der Fragment-Analysesoftware als Stutter herausgefiltert.
3. Bei den Mononukleotid-Repeat-Markern wurden keine QC-Fehler beobachtet.

Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, können Daten mithilfe der folgenden Hinweise ausgewertet werden:

1. Wenn mindestens zwei Mononukleotid-Repeat-Marker instabil sind, stufen Sie die Tumorprobe als MSI-H ein.
2. Wenn mindestens vier Mononukleotid-Repeat-Marker stabil sind, stufen Sie die Tumorprobe als MSS ein.



16189TA

Abbildung 13. Beispiel für ein deutliches Allel-Ungleichgewicht. In Fällen eines ausgeprägten Allel-Ungleichgewichts bei Pentanukleotid-Repeat-Markern wird beim Bewegen des Cursors über einem „verlorenen“ normalen Peak im Tumorproben-Elektropherogramm eine schwarze vertikale Linie angezeigt, sofern dieser Peak vorhanden ist und über dem analytischen Schwellenwert liegt, jedoch aufgrund der viel größeren Peak-Höhe des 168 bp des gleichen Panels als Stutter herausgefiltert wurde.

7. Assay-Qualitätskontrollen

7.1 Spektrale Kalibrierung

Während der Kapillarelektrophorese werden farbmarkierte Amplifikationsprodukte des OncoMate® MSI Dx Analysis System nach Größe getrennt und nachgewiesen. Vor der Analyse wird das ausgewählte Kapillarelektrophorese-Gerät mit den Matrixstandards kalibriert, um die Fluoreszenzsignale der spezifischen Farbstoffe zu unterscheiden, die im Assay verwendet werden. Der OncoMate® 5C Matrix Standard (Promega Cat.# MD3580) besteht aus DNA-Fragmenten, die in einem Röhrchen mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Fluoreszein, JOE, TMR-ET, CXR-ET und WEN) markiert sind. Führen Sie eine spektrale Kalibrierung gemäß den in Anhang A (Abschnitt 11.1) angegebenen allgemeinen Parametern durch. Nach der Generierung der spektralen Kalibrierungsdatei wird diese während der Probenerkennung automatisch angewendet, um die spektrale Überlappung unter den Farbstoffen zu berücksichtigen und die Fluoreszenz-Rohsignale in die einzelnen Farbsignale zu trennen.

7.2 Übereinstimmende normale Gewebeprobe

Mononukleotid-Repeat-Marker können zwischen einzelnen Markern eine Heterozygotie oder Abweichung bei den Längen von Normalgewebe-Allelen zeigen (Bacher, 2004). Um solchen Abweichungen in normalen Allelen Rechnung zu tragen, muss eine übereinstimmende normale Gewebeprobe parallel zu jeder Tumorprobe verarbeitet werden. Darüber hinaus kann eine Überprüfung der Normalgewebeprobe wichtig sein, wenn die Tumorprobe auf subtile Änderungen der Allellänge beurteilt wird. Tumorproben enthalten häufig eine Mischung aus normalen und Tumorzellen. Neue Tumorallele können Stutter-Peaks der normalen Zellkomponente im Tumorgewebe überlappen, und es kann daher der direkte Vergleich mit dem normalen Gewebe notwendig sein, um diese Daten auszuwerten. Wenn die Analyse eines Tumors oder einer normalen Probe aus irgendeinem Grund wiederholt werden muss, muss die gepaarte Tumor- oder normale Probe ebenfalls erneut analysiert werden, um möglichen Abweichungen zwischen Durchläufen Rechnung zu tragen.

7.3 Positiv- und Negativkontrollen

Amplifikationsreaktionen von Positiv- und Negativkontrollen (ohne Template) mithilfe von 2800M Control DNA und Water, Amplification Grade müssen gleichzeitig mit Patientenproben analysiert werden, um die Assay-Leistung sicherzustellen. Mindestens eine 2800M Control DNA-Amplifikationsreaktion und eine negative Kontrollamplifikationsreaktionen müssen für jede Patientenproben-Platte durchgeführt werden. Die Reaktion der Negativkontrolle wird analysiert, um sicherzustellen, dass keine unerwartete Amplifikation in Reaktionen ohne Template aufgetreten ist. Eine unerwartete Amplifikation in einer Negativkontrollreaktion weist auf eine DNA-Kontamination, die zu einem ungültigen Assay-Ergebnis führt. Bei Negativkontrollen sollten keine amplifizierten Peaks über dem Analyse-Schwellenwert liegen. Die Positivkontrollreaktion wird analysiert, um zu zeigen, dass die Amplifikationschemie die erwartete Leistung gezeigt hat. Unerwartete Ergebnisse einer Positivkontrolle können auf eine suboptimale oder fehlgeschlagene Amplifikation hinweisen. Siehe Tabelle 8 für erwartete 2800M Control DNA-Ergebnisse.

Tabelle 8. Erwartete Ergebnisse bei der Verwendung von 1 ng 2800M Control DNA.

Markername	2800M-Allele (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

¹Allelgrößen wurden mithilfe des Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit einem POP-7® Polymer und einer einem 50-cm-Kapillar-Array bestimmt. Größen, die mit anderen Geräten oder mit anderen Verbrauchsmaterial-Konfigurationen bestimmt wurden, können leicht abweichen.

²Schwankungen bei der Leistung von Kapillarelektrophorese-Geräten zwischen Geräten und Tagen können zu einem Unterschied von ca. ±1 bp zwischen den erwarteten Allelgrößen der 2800M Control DNA führen.

7.4 Kapillarelektrophorese-Standards

Alle analysierten Proben und Kontrollen müssen den Size Standard 500 enthalten. Der Size Standard 500 enthält eine Serie aus 21 DNA Fragmenten bekannter Längen (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 bp). Jedes Fragment wird in Anwesenheit von auf dem OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifizierten Produkten mit WEN-Farbstoff markiert und separat nachgewiesen (als vierte Farbe, orange). Der Size Standard 500 wird dazu verwendet, den amplifizierten Produkten jeder Probe und Kontrolle mithilfe der Local Southern-Methode (Southern, 1979) Größen zuzuweisen. Der Größenstandard kontrolliert Schwankungen der Größengenauigkeit zwischen Kapillaren während der Kapillarelektrophorese und ermöglicht den direkten Vergleich von Proben über Kapillarelektrophorese-Durchläufe hinweg. Nur 60 bp bis 300 bp-Fragmente werden mit der ausgewählten Fragment-Analysesoftware analysiert.

7.5 Analytischer Schwellenwert

Bei der Datenanalyse mit der Fragment-Analysesoftware muss ein analytischer Schwellenwert festgelegt und angewendet werden, um eine zuverlässige MSI-Auswertung sicherzustellen. Es sind verschiedene Methoden zur Festlegung eines geeigneten analytischen Schwellenwerts verfügbar und diese können in Veröffentlichungen gefunden werden (z. B. Bregu, 2013). Bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System haben wir mithilfe des Ansatzes zur oberen Grenze, der auf der linearen Regression von Peak-Intensitäten aus Proben mit unterschiedlichen DNA-Inputs beruht (Bregu, 2013), einen analytischen Schwellenwert von 175 RFU bestimmt.

8. Spezifische Einschränkungen

Der Tumorgehalt von Tumorproben kann die Fähigkeit der Fragment-Sizing-Software zur Bestimmung eines Allels beeinträchtigen. Der Tumorgehalt muss $\geq 20\%$ betragen und die Häufigkeit der kernhaltigen Zellen muss ausreichen, und zwar basierend auf pathologischer Standardcharakterisierung. Tumorproben, die diese Kriterien nicht erfüllen, sind nicht für die Verwendung mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System geeignet.

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde mithilfe von Input-DNA evaluiert, die aus FFPE-Dickdarm-Gewebeproben mithilfe des Maxwell® CSC Instrument und des Maxwell® CSC FFPE DNA Kit aufgereinigt wurde, gefolgt von der Analyse der Amplifikationsprodukte mithilfe des Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit der GeneMapper® Software Version 5.0. Bevor der Benutzer andere DNA-Extraktionsmethoden, Kapillarelektrophorese-Geräte, Fragment-Analysesoftware oder Analysemethoden verwendet, muss er bestimmen, ob diese Methoden für die Verwendung mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System geeignet sind.

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist für die Verwendung mit extrahierter DNA aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE-)Gewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom vorgesehen. Die Leistung mit DNA aus anderen Probenarten oder mit anderen Fixiermitteln wurde nicht nachgewiesen.

Die Fragment-Sizing-Software hat verschiedene Möglichkeiten, ein verändertes Tumorallel oder Mikrosatelliten-Markermuster zu bestimmen. Vergleichen Sie für eine genaue Auswertung die Tumorprobe mit einer Normalgewebeprobe des gleichen Patienten.

Die im System enthaltenen Mikrosatelliten-Loci sind quasi-monomorph. In seltenen Fällen wurden heterozygote Allel-Muster beobachtet. Vergleichen Sie für eine genaue Auswertung die Tumorprobe mit einer Normalgewebeprobe des gleichen Patienten.

Mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendetes Gerät und Gerätezubehör muss in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Herstellers gewartet werden und die für die Verwendung mit diesem Produkt definierten Kriterien erfüllen.

Die klinische Leistung dieses Geräts als Entscheidungshilfe bei der Behandlung von Patienten mit MSI-H- oder MSS-Tumoren wurde nicht nachgewiesen.

9. Fehlerbehebung

Antworten auf Fragen, die hier nicht behandelt werden, finden Sie in der Bedienungsanleitung des Kapillarelektrophorese-Geräts oder wenden Sie sich an Ihre örtliche Promega-Niederlassung oder Ihren Vertriebspartner. Die Kontaktdaten finden Sie unter: www.promega.com oder senden Sie eine E-Mail an: genetic@promega.com

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Die Size Standard 500-Fragmente zeigten eine geringe Auflösung, weniger Fragmente als erwartet oder schwache Peak-Intensitäten, die zu einem Fehler der QC zur Sizing-Qualität führte (Amplikone können auch betroffen sein)	Blasen waren in der Gerätefluidik vorhanden. Folgen Sie den Verfahren des Geräteherstellers für die Entfernung der Luftblasen in der Gerätefluidik, und wiederholen Sie anschließend die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen. Kontaminationen oder Kristallablagerungen waren im Polymer vorhanden. Bei der erneuten Auffüllung des Polymers muss sichergestellt werden, dass es wie vom Hersteller vorgeschrieben, zuerst auf Raumtemperatur gebracht wird. Wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen. Eine oder mehrere Kapillaren waren blockiert. Füllen Sie den Kapillar-Array erneut auf und wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen. Sie müssen unter Umständen einen neuen Kapillar-Array installieren. Der Size Standard 500 wurde nicht in den Kapillarelektrophorese-Ladecocktail gegeben. Stellen Sie frischen Kapillarelektrophorese-Ladecocktail des Size Standard 500 her und wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse für alle Proben und Kontrollen. Die Kapillarspitzen standen nicht in Kontakt mit dem Ladecocktail. Stellen Sie sicher, dass 11 µl der Ladecocktail-Probenmischung in jede Well der 96-Well-Platte gegeben und die Platte vor Start des Kapillarelektrophorese-Durchlaufs kurz zentrifugiert wurde. Wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen. Überprüfen Sie das Elektropherogramm, um die Hauptursache für die QC-Markierung zur Sizing-Qualität zu finden.

Symptome

Ursachen und Anmerkungen

Der Kapillar-Elektrophoresedurchlauf schlug beim Starten fehl

Blasen waren in der Fluidik des Kapillarelektrophorese-Geräts vorhanden. Entfernen Sie Luftblasen gemäß den Herstelleranweisungen. Starten Sie den Kapillar-Elektrophorese-Durchlauf neu.

Auf dem Systemcomputer ist ein Fehler aufgetreten. Starten Sie das Kapillarelektrophorese-Gerät und den Computer des Geräts gemäß den Anweisungen des Herstellers neu und führen Sie anschließend den Durchlauf des Kapillar-Elektrophorese-Geräts erneut aus.

Mindestens ein Verbrauchsmaterial des Geräts ist abgelaufen oder hat das Probenlimit erreicht. Ersetzen Sie das abgelaufene oder verbrauchte Geräteverbrauchsmaterial und starten Sie den Kapillarelektrophorese-Durchlauf neu.

Unerwartete Peaks wurden im Size Standard 500-Farbkanal nachgewiesen, was zu einem Fehler bei der QC der Sizing-Qualität führte.

In Verbindung mit der Kapillarelektrophorese stehende Artefakte. Bei der Kapillarelektrophorese können abweichende Peaks beobachtet werden. Wenn diese den orangenen Farbkanal beeinträchtigen, können die Size Standard 500-Peaks verdunkelt oder die Größen von der Fragment-Analysesoftware falsch zugewiesen werden. Wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen. Wechseln Sie die Kapillarelektrophorese-Verbrauchsprodukte, wenn das Problem bestehen bleibt. Überprüfen Sie das Elektropherogramm, um die Hauptursache für die QC-Markierung zur Sizing-Qualität zu finden.

Bei der 2800M Control DNA wurde eine mangelhafte Amplifikationsreaktion oder ein Ungleichgewicht zwischen Markern bei Allelintensitäten beobachtet (Proben können auch betroffen sein)

Die 2800M Control DNA-Vorratslösung oder die 2800M Control DNA-Verdünnung wurden nicht ausreichend gevortext. Schwache oder zu starke Peak-Intensitäten wurden beobachtet, einschließlich einer übermäßigen Amplifikation von Penta D-Allelen. Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktionen und die Kapillarelektrophorese-Analyse, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen.

Die PCR-Amplifikationsmischung wurde nicht ausreichend vortexiert. Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktionen und die Kapillarelektrophorese-Analyse, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen.

Die 2800M Control DNA-Verdünnung wurde zuvor hergestellt und wiederverwendet. Stellen Sie eine frische Verdünnung der 2800M Control DNA her und wiederholen Sie die Amplifikationsreaktionen und die Kapillarelektrophorese-Analyse, einschließlich einer frisch hergestellten Positivkontrollprobe und einer Negativkontrolle.

Symptome

Geringe Peak-Höhen bei normalen oder Tumorproben. Tumorproben können einen Fehler bei der QC auf Tumorsignale zeigen.

Ursachen und Anmerkungen

Zu wenig Template-DNA. Geringe Peak-Höhen können mit der Datenauswertung interferieren. Allel-Peak-Intensitäten in den Tumorproben müssen hoch genug sein, um sicherzustellen, dass neue Allele, die sich über dem analytischen Schwellenwert befinden, erkannt werden (siehe Abschnitt 6.3.10). Allelintensitäten der normalen Probe müssen $\geq$ dem analytischen Schwellenwert sein. Stellen Sie sicher, dass die DNA sorgfältig quantifiziert und verdünnt wurde, und wiederholen Sie die Amplifikation mit 1,0 ng der Template-DNA, wenn ein Quantifizierungsfehler erkannt wird. Wiederholen Sie die Analyse andernfalls mit mehr DNA. Wenn das Problem bestehen bleibt, wiederholen Sie den Assay mit DNA, die aus einem anderen Gewebeabschnitt gewonnen wurde.

Verunreinigtes DNA-Template. Verunreinigungen in DNA-Proben können die PCR hemmen. Lesen Sie die Anweisungen des Herstellers für Hinweise zur ausgewählten DNA-Extraktionsmethoden. Wenn keine ausreichende DNA-Qualität erzielt werden kann, müssen Sie unter Umständen zu einer anderen DNA-Extraktionsmethode wechseln. Die Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System erfolgte mithilfe aufgereinigter DNA aus CRC FFPE-Gewebeproben auf dem Maxwell® CSC Instrument mit dem Maxwell® CSC FFPE DNA Kit. Andere Methoden bieten unter Umständen nicht die gleiche DNA-Qualität.

Schlechte Kapillarelektrophorese-Injektion (Size Standard 500-Peaks sind ebenfalls betroffen). Wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse betroffener Proben, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen.

Formamid von schlechter Qualität wurde verwendet. Verwenden Sie nur Hi-Di™ 3500 Dx Series Formamide.

Hohe Salzkonzentration oder geänderter pH-Wert. Verdünnen Sie das FFPE DNA-Template nicht in TE-Puffern. Verwenden Sie für die Verdünnung der Template-DNA nur nukleasefreies Wasser.

Probleme mit dem Thermocycler oder der Reaktionsplatte (die Positivkontrollreaktion war ebenfalls betroffen). Bestätigen Sie, dass das richtige PCR-Programm ausgewählt wurde und der ausgewählte Thermocycler die Anforderungen des OncoMate® MSI Dx Analysis System erfüllt (siehe Abschnitt 3.5). Unter Umständen ist eine Kalibrierung des Heizblocks erforderlich. Verwenden Sie nur MicroAmp®-Platten.

Symptome

Geringe Peak-Höhen bei normalen oder Tumorproben. Tumorproben können einen Fehler bei der QC auf Tumorsignale zeigen (Fortsetzung).

Ursachen und Anmerkungen

Proben wurden vor der Kapillarelektrophorese nicht richtig denaturiert. Hitzedenaturieren Sie die Proben 3 Minuten lang und kühlen Sie sie unmittelbar vor der Kapillarelektrophorese 3 Minuten lang auf zerstoßenem Eis oder in einem Eiswasserbad.

Minderwertige oder degradierte DNA. Eine mangelhafte oder ausgedehnte Fixierung Paraffin-eingebetteter Proben kann zu geringen DNA-Ausbeuten und minderwertiger DNA führen. Eine unsachgemäße Lagerung der DNA nach erfolgreicher DNA-Extraktion kann ebenfalls zu einer DNA-Degradierung führen. Wiederholen Sie die Amplifikation mit mehr DNA oder wiederholen Sie die DNA-Vorbereitung mithilfe eines anderen Gewebeschnitts.

Amplifikationsreaktions-Komponenten wurden bei der PCR-Vorbereitung nicht auf die Böden der Wells gegeben. Zentrifugieren Sie die Platte vor dem Thermocycling kurz in einer Miniplattenzentrifuge, um den Inhalt auf die Well-Böden zu bringen und Luftblasen zu entfernen.

Fluoreszenzsignale für Allel-Peaks haben den dynamischen Bereich des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts überschritten

Zu viel Template-DNA. Stellen Sie sicher, dass die DNA sorgfältig quantifiziert und verdünnt ist. Wiederholen Sie die Amplifikation mit 1,0 ng der Template-DNA, wenn ein Quantifizierungsfehler erkannt wird. Gehen Sie andernfalls wie folgt vor: 1) Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktion mit weniger DNA oder 2) verdünnen Sie die Amplifikationsprodukte 1:8 im Ladecocktail (z. B. 1 µl Amplifikationsprodukte plus 7 µl Ladecocktail; siehe Tabelle 4 für die Zusammensetzung des Ladecocktails) und wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse mit 1 µl der verdünnten Amplifikationsprodukte. Stellen Sie sicher, dass die DNA-Extraktionsmethode für FFPE-Gewebeproben geeignet ist und die DNA richtig für die verwendete Methode gelagert wurde.

Symptome

Ursachen und Anmerkungen

Fluoreszenzsignale für Allel-Peaks haben den dynamischen Bereich des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts überschritten (Fortsetzung).

Die FFPE-Proben-DNA war degradiert oder vernetzt. Degradierete oder vernetzte FFPE DNA-Templates können eine präferentielle Amplifikation kleinerer Marker zeigen, insbesondere von NR-21. Verifizieren Sie, dass die richtigen Vorbereitungsbedingungen für FFPE-Proben und die richtigen Lagerbedingungen für FFPE DNA-Extrakte herrschten. Wählen Sie für die Vorgehensweise bei Off-scale-Proben einen der folgenden Ansätze aus: 1) Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktion mit weniger DNA oder 2) verdünnen Sie die Amplifikationsprodukte 1:8 im Ladecocktail (z. B. 1 µl Amplifikationsprodukte plus 7 µl Ladecocktail; siehe Tabelle 4 für die Zusammensetzung des Ladecocktails) und wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse mit 1 µl der verdünnten Amplifikationsprodukte. Wiederholen Sie die Amplifikation mit weniger DNA, wenn das Problem bestehen bleibt. Sie müssen die DNA-Vorbereitung und -Analyse unter Umständen mit einem anderen Gewebeschnitt wiederholen.

In mindestens einem Farbstoff waren unerwartete Peaks sichtbar

Stutter-Peaks wurden für Mikrosatelliten-Allele gehalten. Bei der Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern werden Artefakte erzeugt, die als niedrigere Peaks 1 bp über oder unter den prominenten Mononukleotid-Repeat-Allelen oder 1 bp oder 5 bp über oder unter einem Pentanukleotid-Repeat-Allel erscheinen. Stutter-Produkt-Peaks werden höher, wenn zu viel Template-DNA verwendet wird.

Zu große DNA-Menge. Verwenden Sie 1,0 ng DNA-Template. Die Amplifikation von >4 ng eines DNA-Templates kann zu erhöhten Grundlinien-Artefakten bei BAT-26 und zu einer höheren Anzahl von Stutter-Peaks führen.

Pull-up oder Bleed-through. Pull-up, auch als Bleed-through bezeichnet, kann auftreten, wenn Peaks zu hoch sind oder die Qualität der spektralen Kalibrierung schlecht war. Wiederholen Sie die spektrale Kalibrierung des ausgewählten Kapillarelektrophorese-Geräts. Stellen Sie sicher, dass die DNA sorgfältig quantifiziert und verdünnt ist. Wiederholen Sie die Amplifikation mithilfe von 1,0 ng Template-DNA. Wiederholen Sie die Amplifikation mit weniger DNA, wenn das Problem bestehen bleibt.

Proben wurden vor dem Laden nicht richtig denaturiert. Hitzedenaturieren Sie die Proben 3 Minuten lang und kühlen Sie sie unmittelbar vor der Kapillarelektrophorese 3 Minuten lang auf zerstoßenem Eis oder in einem Eiswasserbad.

Symptome

Ursachen und Anmerkungen

In mindestens einem Farbstoff waren unerwartete Peaks sichtbar (Fortsetzung)

In Verbindung mit der Kapillarelektrophorese stehende Artefakte. Bei der Kapillarelektrophorese können abweichende Peaks beobachtet werden. Stellen Sie sicher, dass das Polymer vor der Installation und dem Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt wird. Wiederholen Sie die Injektionen. Wiederholen Sie die Amplifikation und die Kapillarelektrophorese, wenn das Problem bestehen bleibt.

Kontamination von Kontroll- oder Patientenproben mit einer anderen Template-DNA oder einem anderen amplifizierten Produkt. Kreuzkontamination kann ein Problem darstellen. Verwenden Sie Aerosol-beständige Pipettenspitzen und wechseln Sie die Handschuhe regelmäßig.

Eine instabile Tumorprobe wurde fälschlicherweise als normale Referenzprobe analysiert. Stellen Sie sicher, dass die Proben richtig identifiziert und bezeichnet sind. Wiederholen Sie die Amplifikation und Kapillarelektrophorese-Analyse betroffener Proben, um die vermutete Hauptursache zu bestätigen.

Präferenzielle Amplifikation kleinerer Marker

DNA wurde vernetzt. Die aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Proben sind oft mit anderer DNA oder anderen DNA-Molekülen vernetzt, was die Amplifikation längerer DNA-Fragmente verhindert. Wiederholen Sie die Amplifikation mit mehr DNA. Wenn die Sättigung kleinerer Marker bei mehr DNA beobachtet wird, wiederholen Sie die DNA-Extraktion und die Probenanalyse mithilfe eines anderen Gewebeschnitts. Wenn das Problem bestehen bleibt, ist die Qualität der FFPE-Gewebeprobe möglicherweise zu gering für eine erfolgreiche Analyse.

Degradierter DNA. Das DNA-Template wurde in kleinere Fragmente degradiert, wobei die größeren Marker eine verringerte Ausbeute zeigen. Verifizieren Sie die richtigen Lagerbedingungen für die 2800M Control DNA und die FFPE DNA-Proben. Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktion mit mehr DNA. Wenn die Sättigung kleinerer Marker bei mehr DNA beobachtet wird, wiederholen Sie die DNA-Extraktion und die Probenanalyse mithilfe eines anderen Gewebeschnitts. Wenn das Problem bestehen bleibt, ist die Qualität der FFPE-Gewebeprobe möglicherweise zu gering für eine erfolgreiche Analyse.

Symptome	Ursachen und Anmerkungen
Präferenzielle Amplifikation kleinerer Marker (Fortsetzung)	Zu wenig Template-DNA. Stellen Sie sicher, dass die DNA sorgfältig quantifiziert und verdünnt ist, und wiederholen Sie die Amplifikation mit 1,0 ng der Template-DNA, wenn ein Quantifizierungsfehler erkannt wird. Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktion mit mehr DNA, oder wiederholen Sie die DNA-Vorbereitung mithilfe eines anderen Gewebeschnitts, wenn das Problem bestehen bleibt.
Mindestens ein Pentanukleotid-Allel, das in der normalen Probe vorhanden ist, war in der Tumorprobe nicht vorhanden	Normale und Tumor-DNA-Proben von verschiedenen Personen wurden als Probenpaar analysiert. Stellen Sie sicher, dass normale oder Tumorproben auf der PCR-Platte und während der Kapillarelektrophorese-Analyse richtig gepaart waren. Stellen Sie sicher, dass sie richtig bezeichnet wurden. Wiederholen Sie die Kapillarelektrophorese-Analyse der betroffenen Proben bei korrekter Probenpaarung, einschließlich der Positiv- und Negativkontrollreaktionen. Wiederholen Sie die Amplifikationsreaktionen, wenn das Problem bestehen bleibt. Tumorproben zeigen einen Verlust der Heterozygotie. Siehe Abschnitt 6.5.3 und Abbildung 13 für weitere Informationen über die Auswertung der Daten dieser Tumorproben.

Jeder schwerwiegende Vorfall in Zusammenhang mit dem Produkt, der zum Tod oder zu schweren Verletzungen eines Anwenders oder Patienten geführt hat oder führen könnte, ist dem Hersteller unverzüglich zu melden. Anwender mit Sitz in der Europäischen Union sollten alle schwerwiegenden Vorfälle zudem der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, melden.

10. Literaturangabe

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. Weitere Informationen

Für dieses Produkt ist ein Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP) verfügbar, wie in Artikel 29 der Verordnung (EU) 2017/746 vorgeschrieben. Der SSP wird in EUDAMED öffentlich zugänglich sein, sobald EUDAMED voll funktionsfähig ist. Bis dahin können Sie das Dokument erhalten, indem Sie es direkt bei Promega anfordern.

Die Kontaktdaten finden Sie unter: **www.promega.com**; E-Mail: **genetic@promega.com**

11.1 Anhang A

Die verwendeten Einstellungen für die spektrale Kalibrierung im Rahmen der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer sind unten gezeigt.

Die folgenden Einstellungen eignen sich für die Durchführung der spektralen Kalibrierung mit den Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers:

Dye set Template (Farbstoffsatz-Template): AnyDye (Serie 3500)

Dye Order (Farbstoff-Reihenfolge): 5, blue; 4, green; 3, yellow; 2, red; 1, orange (purple deaktiviert)

Matrix Condition Number Upper Limit (Obergrenze der Matrix-Konditionszahl): 8,0

Locate Start Point After Scan (Startpunkt nach Scan lokalisieren): 300

Locate Start Point Before Scan (Startpunkt vor Scan lokalisieren): 5000

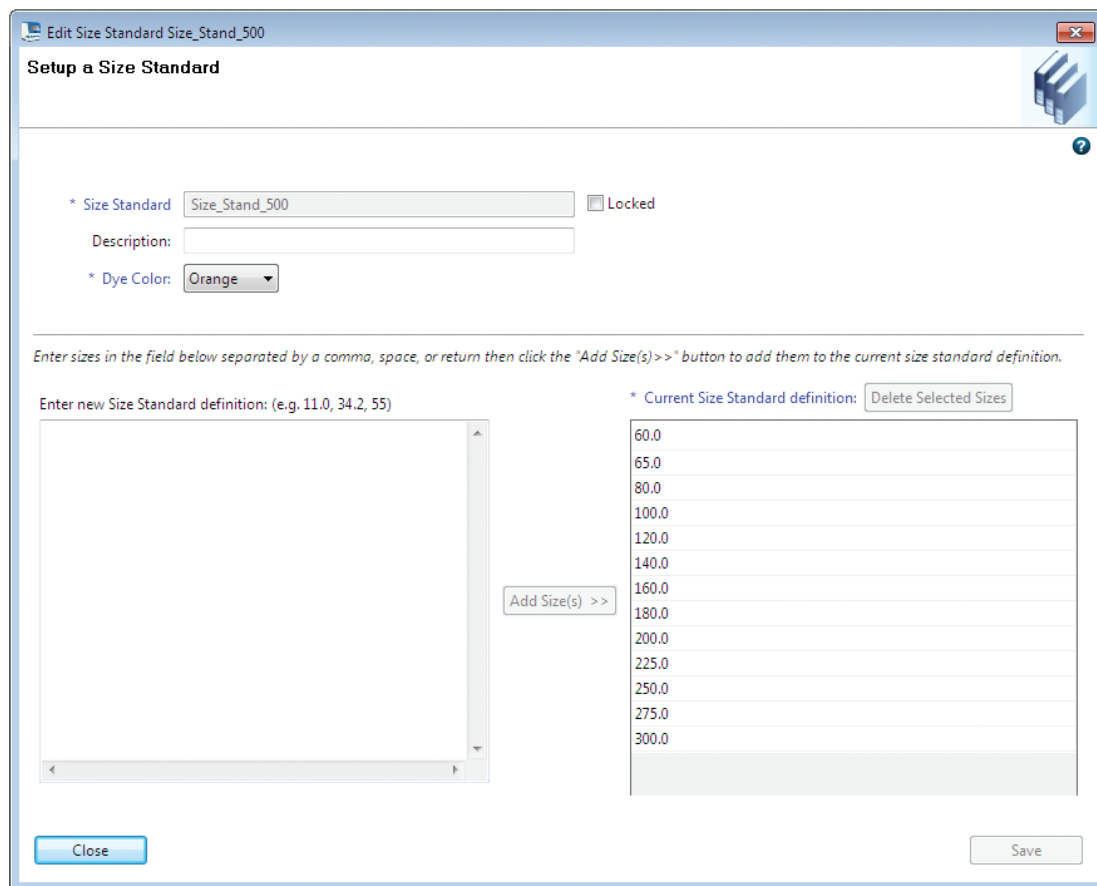
Limit Scans to (Scans beschränken auf): 6500

Sensitivity (Empfindlichkeit): 0,4

Minimum Quality Value (Minimaler Qualitätswert): 0,95

11.2 Anhang B

Die verwendeten Einstellungen für die Fragmentanalyse Im Rahmen der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer sind unten gezeigt.



16190TA

Abbildung 14. Kapillarelektrophorese-Gerät – Definition von „Size Standard“ (Größenstandard).

Edit Instrument Protocol FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDye_11s

Setup an Instrument Protocol

Instrument Protocol Setup Help ?

Application Type: Capillary Length: cm Polymer:

Dye Set: ☐ Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

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

* Protocol Name: ☐ Locked

Description:

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

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

▼ Advanced Options

Following values are not recommended to be changed.

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

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

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

16191TA

Abbildung 15. Kapillarelektrophorese-Gerät – „Instrument Protocol“ (Geräteprotokoll-)Einstellungen.

Edit Sizecalling Protocol Fragment_Analysis_MSI

Setup a Sizecalling Protocol

* Protocol Name: ☐ Locked

Description:

Size Standard:

Sizecaller:

Analysis Settings **QC Settings**

Analysis Range: Sizing Range: Size Calling Method:

Analysis Start Point: Sizing Start Size: Primer Peak:

Analysis Stop Point: Sizing Stop Size:

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

Common Settings

Use Smoothing

Use Baseline (Baseline Window (Pts)) ☒

Minimum Peak Half Width

Peak Window Size

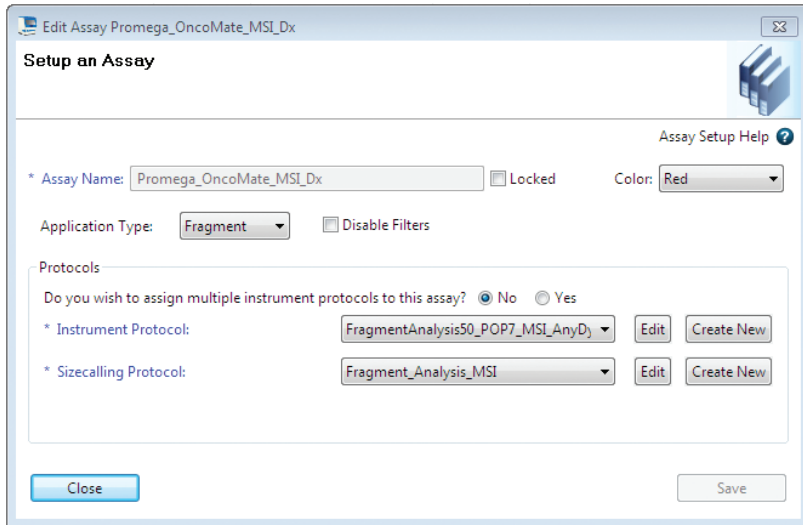
Polynomial Degree

Slope Threshold Peak Start

Slope Threshold Peak End

16192TA

Abbildung 16. Kapillarelektrophorese-Gerät – Einstellungen des „Sizecalling Protocol“ (Size-Calling-Protokoll).



Edit Assay Promega_OncoMate_MSI_Dx

Setup an Assay

Assay Setup Help ?

* Assay Name: Promega_OncoMate_MSI_Dx ☐ Locked Color: Red

Application Type: Fragment ☐ Disable Filters

Protocols

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

* Instrument Protocol: FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDy Edit Create New

* Sizing Protocol: Fragment_Analysis_MSI Edit Create New

Close Save

16193TA

Abbildung 17. Kapillarelektrophorese-Gerät – „Assay“-Einstellungen.

11.3 Anhang C

Datenanalyse-Einstellungen für den GeneMapper® 5.0 bei der Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System.

Hinweis: Anweisungen zu den GeneMapper®-Einstellungsdateien und zur Datenanalyse sollen nur als Hilfestellung dienen und gelten speziell für die Kapillarelektrophorese-Daten, die mit einem 50-cm-Array und dem POP-7® Polymer generiert wurden. Anwender, die auf dem OncoMate® MSI Dx Analysis System amplifizierte Produkte mit anderen Kapillarelektrophorese-Gerätekonfigurationen analysieren, müssen verifizieren, ob die Anweisungen zur Datenanalyse für ihre spezifische Gerätekonfiguration geeignet sind. Vom Anwender erstellte Analysemethoden sind unter Umständen für eine vorgegebene Gerätekonfiguration besser geeignet.

Importieren von Einstellungsdateien für den GeneMapper

Um die Analyse der Daten zu erleichtern, die mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System generiert wurden, haben wir Dateien (Panels, Analysis Method (Analysemethode), Size Standard (Größenstandard), Plot Settings (Diagrammeinstellungen), Table Settings (Tabelleneinstellungen) und Report Settings (Berichteinstellungen)) für den Import in die GeneMapper® Software Versionen 5.0 und 6.0 erstellt. Diese können über die Promega-Website heruntergeladen werden: **www.promega.com/OncomatePanels**. Definitionen von Panels, Size Standards (Größenstandards) und Analysis Methode (Analysemethoden) finden Sie ebenfalls weiter unten (Tabellen 9 und 10, Abbildung 19). Siehe die Literatur zu den Versionen 5.0 und 6.0 der GeneMapper® Software für weitere Informationen.

1. Öffnen Sie die GeneMapper® Software, Version 5.0 oder 6.0.
2. Wählen Sie **Tools (Werkzeuge)** und anschließend **Panel Manager (Panel-Manager)** aus.
3. Wählen Sie im oberen linken Bereich **Panel Manager (Panel-Manager)** aus (Abbildung 18).
4. Wählen Sie im Menü **File (Datei)** und anschließend **Import Panels (Panels importieren)** aus. Das Panel Manager-Symbol muss ausgewählt sein (blau hervorgehoben), damit die Option **Import Panels (Panels importieren)** zur Auswahl steht.
5. Navigieren Sie zu dem Ort, an dem die Panels-Textdatei auf Ihrem Computer gespeichert ist. Wählen Sie die Datei **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** und anschließend **Import (Importieren)** aus.
6. Wählen Sie unten im Panel Manager-Fenster **Apply (Übernehmen)** und anschließend **OK** aus.
7. Wählen Sie **Tools (Werkzeuge)** und anschließend **GeneMapper Manager (GeneMapper-Manager)** aus.
8. Wählen Sie die Registerkarte „Size Standards“ (Größenstandards), und anschließend unten im GeneMapper Manager-Fenster **Import (Importieren)** aus.
9. Navigieren Sie zum Ort, an dem die Größenstandard-Datei auf Ihrem Computer gespeichert ist. Wählen Sie die Datei **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0 (OncoMate_MSI_Dx_Größe_v1.0)** und anschließend **Import (Importieren)** aus.
10. Wiederholen Sie bei geöffnetem GeneMapper Manager das in den Schritten 8 und 9 beschriebene Verfahren für den Import der restlichen Einstellungsdateien (Analysis Method (Analysemethode), Plot Settings (Diagrammeinstellungen), Table Settings (Tabelleneinstellungen) und Report Settings (Berichteinstellungen)).
11. Wählen Sie, wenn alle Dateien importiert wurden, unten im GeneMapper Manager-Fenster **Done (Fertig)** aus.

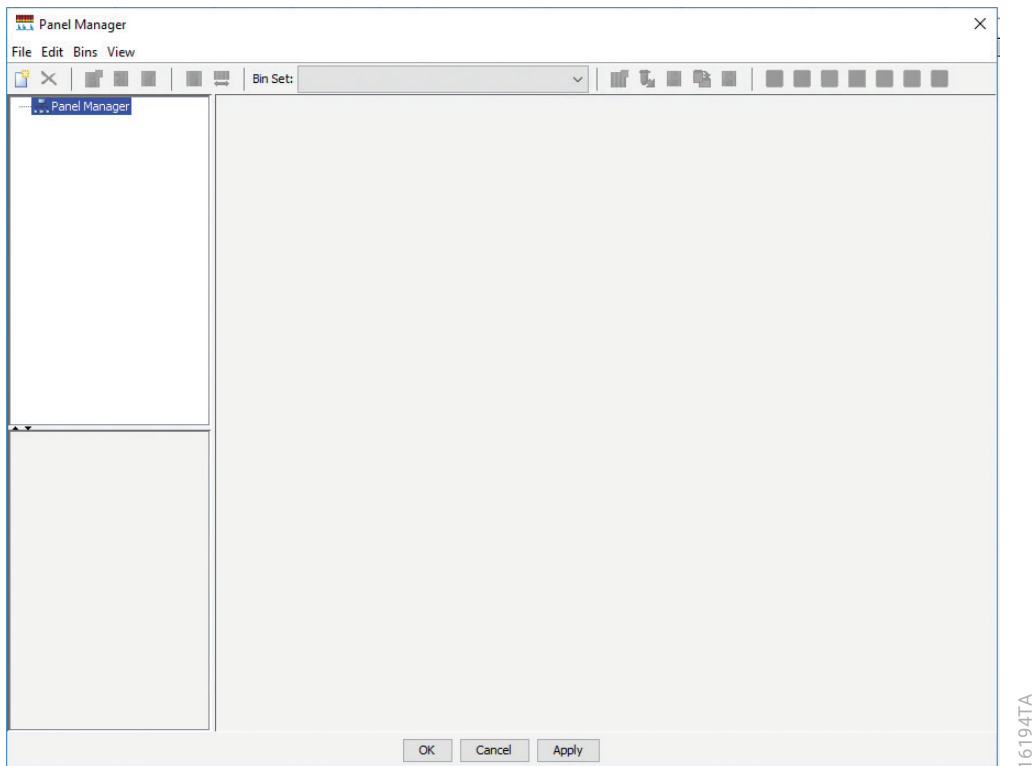


Abbildung 18. Das GeneMapper® Panel Manager-Fenster, mit ausgewähltem Symbol Panel Manager (Panel-Manager).
Auf die Option „Import Panels“ (Panels importieren) (Schritt 4) kann über das Menü „File“ (Datei) zugegriffen werden, wenn das Panel Manager-Symbol aktiviert ist (blau hervorgehoben).

Tabelle 9. Definition des Marker-Panel.

Marker	Farbkanal	Panel-Bereich (bp) ¹		Wiederholungstyp ²
		Start	Ende	
BAT-26	blau	83	121	1
Penta D	blau	123	253	5
NR-21	grün	83	108	1
BAT-25	grün	110	132	1
MONO-27	grün	134	168	1
NR-24	gelb	103	138	1
Penta C	gelb	140	228	5

¹Der für Amplikone erwartete Größenbereich muss für jeden Marker in der ausgewählten Fragment-Analysesoftware festgelegt werden.

²Der Mikrosatelliten-Typ ist in der Tabelle auf 1 festgelegt (für Mononukleotid-Repeat-Marker) und 5 (für Pentanukleotid-Repeat-Marker).

Tabelle 10. Definition Size Standard (Größenstandard). Der Size Standard 500 enthält Fragment-Peaks von 60 bp bis 500 bp, obwohl die Analyse der 60-bp- bis 300-bp-Fragment-Peaks für die Größenbestimmung von OncoMate® MSI Dx Analysis System-Fragmenten ausreicht.

Size Stan- dard-Fragment-Nr.	Fragmentgröße (bp)
1	60
2	65
3	80
4	100
5	120
6	140
7	160
8	180
9	200
10	225
11	250
12	275
13	300

Analysis Method Editor - Microsatellite

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

Bin Set:

Marker Repeat Type

☐ Use marker-specific stutter ratio if available
Values for dinucleotide repeats are calculated automatically.

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

Range Filter... Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

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

Peak Detection Algorithm:

Ranges

Analysis: Sizing:
Start Pt: 300 Start Size: 50
Stop Pt: 10000 Stop Size: 000

Smoothing and Baseline

Smoothing: ☒ None ☐ Light ☐ Heavy
Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

☐ 2nd Order Least Squares
☐ 3rd Order Least Squares
☐ Cubic Spline Interpolation
☒ Local Southern Method
☐ Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:
B: 175 R: 175
G: 175 P: 175
Y: 175 O: 175

Min. Peak Half Width: 2 pts
Polynomial Degree: 3
Peak Window Size: 11 pts

Slope Threshold
Peak Start: 0.0
Peak End: 0.0

Size Standard Normalization
☐ Enable Normalization
Note: For 35XX series data collection normalization only.

Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

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

Signal level

Homozygous min peak height: 200.0
Heterozygous min peak height: 100.0

Heterozygote balance

Min peak height ratio: 0.5

Peak morphology

Max peak width (basepairs): 0.75

Pull-up peak

Pull-up ratio: 0.1
Pull-up scan: 1

Allele number

Max expected alleles: 2

Cross-talk peak

Cross-talk ratio: 0.05

Factory Defaults

OK Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

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

Quality weights are between 0 and 1.

Quality Flag Settings

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

PQV Thresholds

Pass Range: From 0.75 to 1.0 Low Quality Range: From 0.0 to 0.25

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

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

Factory Defaults

OK Cancel

Abbildung 19. Für die Leistungsbewertung des OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendete Analyseereinstellungen.

12. Analytische Leistung

Alle analytischen Studien folgten dem Verfahren, das im *Technischen Handbuch zum OncoMate® MSI Dx Analysis System* Nr. TM595 beschrieben ist. Die im Workflow verwendeten Materialien und Geräte entsprachen den in diesem technischen Handbuch aufgeführten Anforderungen. Konkret erfolgte die DNA-Extraktion für diese Studien mit dem Maxwell® CSC Instrument und Maxwell® CSC DNA FFPE Kit. Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit dem QuantiFluor® dsDNA System. Die Trennung und der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgten mit dem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer mit POP-7® Polymer und 50-cm-Kapillar-Array. Schließlich erfolgte die Datenanalyse mit einer Software, die in Europa nicht erhältlich ist. Daher wurde eine Konkordanzstudie durchgeführt, um eine alternative Datenanalysemethode, bei der die Software GeneMapper® 5.0 für das Fragment-Sizing und zur grundlegenden Beurteilung der Datenqualität verwendet wird, mit der für die Studien verwendeten Software zu vergleichen, um die Äquivalenz nachzuweisen.

12.1 DNA-Extraktion

Die Eignung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit bei Verwendung des Maxwell® CSC Instrument zur DNA-Extraktion wurde durch die Durchführung von DNA-Extraktionen aus FFPE-Curls (0,1–2,0 mm³ Gewebe) nachgewiesen, die aus drei MSI-H-Tumorproben, drei MSS-Tumorproben und übereinstimmenden Normalproben gewonnen wurden. Die MSI-H-Proben wiesen einen Tumorgehalt von 20–30 % auf, die MSS-Proben einen Tumorgehalt von 20–60 %. Die DNA-Extraktion wurde von jeweils zwei Bedienern mit drei Chargen des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit durchgeführt. Die Chargen des DNA-FFPE-Kits wurden zwischen den Bedienern abgewechselt (z. B. verwendete Bediener 1 an Tag 1 die Charge 1 und Bediener 2 verwendete an Tag 1 die Charge 2). Nach der Isolierung wurde die extrahierte DNA mithilfe des QuantiFluor® dsDNA System quantifiziert und mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde mit einem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer einer Kapillarelektrophorese unterzogen und mit einer Fragmentanalyse-Software analysiert.

In der Studie lieferten 96,4 % (81/84) der einzelnen extrahierten FFPE-Curls Ergebnisse, die mit dem vorab bestimmten MSI-Status übereinstimmten. Die 95%-Konfidenzintervalle (CI) für den Prozentsatz der richtigen und der falschen Ergebnisse lagen bei 89,9–99,3 % bzw. 0,7–10,1 %.

Die Studie zeigte, dass das Maxwell® CSC Instrument bei Verwendung des Maxwell® CSC DNA FFPE Kit zur DNA-Extraktion die Extraktionsanforderungen für den Einsatz mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System erfüllt.

12.2 Normalbereich und Grenzwerte

Das OncoMate® MSI Dx Analysis System ist zur Messung von Veränderungen der Länge amplifizierter Fragmente vorgesehen. Die Studie zu Normalbereich und Grenzwerten wurde durchgeführt, um zu verifizieren, dass das System Amplikone auflösen kann, die sich um ≥ 3 Basenpaare unterscheiden. Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Sätze mit jeweils sieben synthetischen DNA-Fragmenten („Auflösungsmarker“) analysiert. Diese Fragmente bestehen aus farbstoffmarkierten Amplikonen bekannter Größe, die innerhalb jedes Satzes um 1 bp getrennt sind. Die beiden Sätze sind so konzipiert, dass sie das obere Ende (groß) und das untere Ende (klein) des Amplikon-Größenbereichs der MSI-Marker (83–168 bp) umfassen.

Die Auflösungsmarker wurden mit einem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer einer Kapillarelektrophorese unterzogen und mit der Software GeneMapper® 5.0 analysiert. Die Auflösungsmarker wurden entweder ausschließlich mit dem Size Standard 500 gemischt und analysiert oder separat mit zwei MSS-Tumorproben und dem Size Standard 500 gemischt und analysiert. Die Sizing-Genauigkeit der einzelnen Auflösungsmarkerfragmente wurde charakterisiert (Tabelle 11), und die Unterschiede zwischen allen durch 3 bp getrennten Fragmenten wurden berechnet und gemittelt.

Die Größe der Auflösungsfragmente wurde genau bestimmt, wobei die Standardabweichungen bei den 20 analysierten Replikaten bei 0,07–0,13 bp lagen. Die für durch 3 bp getrennten Fragmente berechneten mittleren absoluten Unterschiede waren ebenfalls genau und lagen bei den beobachteten Werten bei 3,06–3,40 bp. Dementsprechend erreichte die Studie das Ziel einer Auflösung von ≥ 3 Basenpaaren und zeigte eine Messgenauigkeit einzelner Auflösungsmarker (Standardabweichungen $\leq 0,13$ Basenpaare), die ausreichte, um Größenunterschiede von einem einzelnen Basenpaar zu erkennen.

Tabelle 11. Deskriptive Statistik für die Basenpaargröße von Auflösungsmarkern.

Auflösungs- marker	N	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	Stan- dardabweichung	95-%-CI	
							Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
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 Erfassungsgrenze

Eine Studie zur Erfassungsgrenze wurde durchgeführt, um zu bestätigen, dass eine Blindprobe (in dieser Studie eine MSS-Probe) keine positiven MSI-H-Ergebnisse lieferte. Im Rahmen der Studie wurden vier bekannte MSS-Proben mit drei Chargen von Amplifikationskits von zwei Bedienern und mit jeweils 60 Replikaten pro MSS-Probe getestet – insgesamt ergaben sich 1440 Testergebnisse.

Bei allen Tests (1440/1440; 100 %) lautete das endgültige Interpretationsergebnis „MSS“. Die 1440 Testergebnisse repräsentieren 7200 Allel-Calls von Mononukleotid-Loki. Bei den Mononukleotid-Loki lauteten 99,99 % (7199/7200) der Markerstabilitäts-Calls „Stable“ (Stabil). Es gab einen einzigen Fall, in dem ein Locus, NR-21, als instabil ausgegeben wurde. Ein einzelner instabiler Locus führt zu einem endgültigen Interpretationsergebnis von „MSS“; dieser eine instabile Locus hatte keinen Einfluss auf das endgültige Testergebnis. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das OncoMate® MSI Dx Analysis System hoch reproduzierbare MSS-Ergebnisse liefert, die weder von der Charge noch vom Bediener beeinflusst wurden.

12.4 Nachweisgrenze

Die analytische Sensitivität des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde mithilfe von extrahierter DNA bestimmt, die aus sechs MSI-H-Tumorproben und übereinstimmenden Normalproben isoliert wurde, sowie mithilfe einer Titrationsserie der 2800M Control DNA. Die 2800M Control DNA wurde wie eine MSS-Probe gehandhabt. Um einen Tumorgehalt von 20 % (den erforderlichen Mindesttumorgehalt) zu erzielen, wurden die Tumorproben nach Bedarf mit den übereinstimmenden Normalproben vermischt. Die MSI-H-Proben und die MSS-Proben wurden mit 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 und 2,5 ng DNA pro Amplifikationsreaktion getestet, mit 20 Replikaten für jede Probe und jede DNA-Menge (fünf MSI-H-Fälle × 20 Wiederholungen). Um den Einfluss des Tumorgehalts auf die Nachweisgrenze (LOD) zu bewerten, wurde eine Tumorprobe mit der übereinstimmenden Normalprobe gemischt, um einen Tumorgehalt von 5 %, 10 %, 15 % und 20 % zu simulieren.

Von jeder DNA-Probe wurden vier Replikate von zwei Bedienern mit jeweils zwei Chargen der Reagenzien des OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit für fünf Tage amplifiziert. Da es auf Basis der untersuchten DNA-Menge keine Fehler gab, war zur Ermittlung der Nachweisgrenze (LOD) eine zusätzliche Menge erforderlich. Es wurde eine neue Probenverdünnungsreihe vorbereitet, um Tests mit 0,1 ng pro Reaktion durchzuführen. Dabei wurden Proben mit einem Tumorgehalt von 20 % sowie eine Probe mit einem Tumorgehalt von 2,5 % verwendet.

Eine Zusammenfassung der Interpretationsergebnisse für die MSI-H-Fälle ist in Tabelle 12, für die MSS-Fälle in Tabelle 13 und für den Tumorgehalt in Tabelle 14 aufgeführt. In Tabelle 15 ist die niedrigste DNA-Konzentration mit einer Positivitätsrate von 100 % für jede Probengruppe aufgeführt.

Die LOD für das OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde anhand von zwei Dimensionen ermittelt: 1) die Gesamtmenge der für den Assay verwendeten Input-DNA und 2) der Anteil an Tumor-DNA in der Probe. Die LOD für das OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde bei 0,5 ng Input-DNA mit einer Positivitätsrate von 100 % (200/200) bei einem Tumorgehalt von mindestens 20 % festgelegt. Eine kombinierte Chargenanalyse ergab eine Positivitätsrate von 99,5 % (199/200) bei einem DNA-Input von 0,2 ng. Bei einem DNA-Input von 0,2 ng wurde bei einem der zwanzig Replikate für diesen Probenfall mit einer einzigen Reagenziencharge (Tabelle 12) aufgrund eines schwachen Signals ein ungültiges Testergebnis erzielt. Die LOD für das OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde bei 5 % Tumorgehalt mit einer Positivitätsrate von 100 % (40/40) festgelegt, wenn der empfohlene DNA-Input von 1 ng und Proben verwendet wurden, bei denen der Tumorgehalt durch Vermischung mit aus übereinstimmendem Normalgewebe extrahierter DNA angepasst wurde.

Tabelle 12. Häufigkeit der Interpretationsergebnisse aus dem MSI-H Diluted Sample Set für die Studie zum DNA-Input, nach Reagenziencharge.

Charge nach endgültigem DNA-Input (ng)		OncoMate® Interpretationsergebnis		Insgesamt
		MSI-H	Ungültig	
Charge 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
Charge 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
Alle	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

¹Ein ungültiges Ergebnis aufgrund einer zu geringen Allel-Peakhöhe

Tabelle 13. Häufigkeit der Interpretationsergebnisse aus dem MSS Diluted Sample Set für die Studie zum DNA-Input, nach Reagenziencharge.

Charge nach endgültigem DNA-Input (ng)		OncoMate® Interpretationsergebnis		Insgesamt
		MSS	Ungültig	
Charge 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
Charge 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
Alle	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

Tabelle 14. Häufigkeit der Interpretationsergebnisse aus dem MSI-H Blended Sample Set für die Studie zur Tumorkonzentration, nach Reagenziencharge.

Charge nach Tumorgehalt (%)		OncoMate® Interpretationsergebnis		Insgesamt
		MSI-H	MSS	
Charge 1	2,5	0	20	20
	5	20	0	20
	10	20	0	20
	15	20	0	20
	20	20	0	20
Charge 2	2,5	0	20	20
	5	20	0	20
	10	20	0	20
	15	20	0	20
	20	20	0	20
Alle	2,5	0	40	40
	5	40	0	40
	10	40	0	40
	15	40	0	40
	20	40	0	40

Tabelle 15. Niedrigster DNA-Input für ein Ergebnis mit 100 % Positivitätsrate ($H_i = 1,00$)¹ für die Studie zur LOD der DNA-Eingabe für jede Probengruppe.

Probengruppe	Probenset	Niedrigster DNA-Input (ng)	
		Charge 1	Charge 2
CRC-066	MSI-H, verdünnt	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, verdünnt	0,2	0,2

¹Die LOD basierte auf dem niedrigsten Input, bei dem eine Positivitätsrate von 100 % erreicht wurde, $H_i = 1,00$. „Positiv“ entsprach einem korrekten Interpretationsergebnis.

²Eine kombinierte Chargenanalyse deutet auf eine Positivitätsrate von 99,5 % (199/200) bei einem DNA-Input von 0,2 ng hin (siehe Tabelle 12).

12.5 Analytische Spezifität

Die Primerpaare für die sieben Marker des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurden mithilfe des öffentlich zugänglichen Suchtools „Primer BLAST“ auf der Website des US-amerikanischen National Center for Biotechnology Information geprüft (<https://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, abgerufen am 14.01.2020). Die Primer stimmen zu 100 % mit ihren vorgesehenen Zielen überein und die mit Primer BLAST gefundenen Ergebnisse sagten eine spezifische Zielamplifikation voraus.

In einer Studie zur analytischen Spezifität wurde die Primerspezifität des OncoMate® MSI Dx Analysis System evaluiert und die Kompatibilität des Systems mit verschiedenen Thermocycler-Modellen nachgewiesen.

Die Replikate der 2800M Control DNA wurde wie MSS-Proben gehandhabt. Die Proben wurden mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System Amplification Kit mit 1 ng, 2 ng oder 4 ng DNA auf jeweils drei verschiedenen Thermocycler-Modellen amplifiziert. Die Thermocycler (Applied Biosystems Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Eppendorf MasterCycler® Nexus SX1 Thermal Cycler und BioRad C1000 Touch™ Thermal Cycler) erfüllen alle die folgenden erforderlichen Leistungsspezifikationen:

Maximale Block-Rampingrate: 3,9 °C/Sekunde bis 5 °C/Sekunde

Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,25$ °C (bei ≥ 90 °C)

Temperaturgleichmäßigkeit: $< 0,5$ °C (bei ≥ 90 °C)

Beheizter Deckel, der 103–105 °C erreichen kann

Bei allen Proben stimmten die erwarteten und die beobachteten MSS-Calls zu 100 % überein (36/36). Bei der Verwendung verschiedener Thermocycler wurden keine Artefakte beobachtet, die die Fähigkeit des Systems beeinträchtigten, das erwartete Interpretationsergebnis zu liefern.

12.6 Störsubstanzen

Es wurde eine Studie durchgeführt, die den möglichen Einfluss von Störsubstanzen auf die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System untersuchte, insbesondere von chaotropen Salzen, Alkohol, der Einwirkzeit von Proteinase K, nekrotischem Gewebe, Hämoglobin, Triglyceriden und Mucin. Die DNA wurde aus Probe-Curls (0,1–2 mm³ Gewebe) extrahiert. Für jede Probe wurden unter jeder getesteten Bedingung zwei DNA-Extraktionen mit dem Maxwell® CSC Instrument und dem Maxwell® CSC DNA FFPE Kit durchgeführt.

In der ersten Reihe von Experimenten wurden Lysate aus vier Tumorproben und übereinstimmenden Normalproben vor der DNA-Extraktion mit Hämoglobin (Endkonzentration 2 mg/ml), Triglyceriden (Endkonzentration 37 mM) oder Mucin (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt. Nach der Analyse mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System lieferten alle Proben das erwartete Ergebnis.

Vier Tumorproben und übereinstimmende Normalproben (jeweils zwei Replikate pro Probe, also insgesamt 16 Extraktionen) wurden vor der Aufreinigung bei 56 °C in Anwesenheit von Proteinase K 20 Minuten, 30 Minuten (empfohlene Bedingung) oder 40 Minuten lang inkubiert. Alle Proben lieferten das erwartete Ergebnis.

Zwölf Tumorproben mit einem Anteil an nekrotischem Gewebe von 0 % bis etwa 75 % sowie übereinstimmende Normalproben wurden untersucht. Alle Proben lieferten das erwartete Ergebnis.

Um die Auswirkungen von möglicherweise aus dem DNA-Aufreinigungsprozess übertragenem Alkohol oder übertragenen Guanidinsalzen zu evaluieren, wurden Aliquots der extrahierten DNA aus Tumorproben und übereinstimmenden Normalproben mit unterschiedlichem Anteil an Gewebenekrose (0 % bis etwa 75 %) vor der Amplifikation und Analyse mit Ethanol (Endkonzentration 5 %), Guanidinhydrochlorid (Endkonzentration 50 µM) oder Wasser versetzt. Alle Proben lieferten das erwartete Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das OncoMate® MSI Dx Analysis System keine statistisch signifikanten Auswirkungen der Störsubstanzen auf die Assay-Leistung zeigte. In dieser Studie wurden insbesondere chaotrope Salze (50 µM Guanidinhydrochlorid), Ethanol (5 %), nekrotisches Gewebe (0–75 %), Hämoglobin (2 mg/ml), Triglyceride (37 mM) und Mucin (1 mg/ml) oder die Proteinase-K-Verdauungszeit [20, 30 (Standard) oder 40 Minuten] getestet (Tabelle 16).

Tabelle 16. Probenbehandlung mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System nach Interpretationsergebnis.

	Interpretationsergebnis ¹				Insgesamt	
	MSI-H		MSS			
Probenbehandlung	N	%	N	%	N	%
20 Minuten bei 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
30 Minuten bei 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
40 Minuten bei 56 °C	4	50,0	4	50,0	8	100
Ethanol-Anreicherung	8	50,0	8	50,0	16	100
Guanidin-Anreicherung	8	50,0	8	50,0	16	100
Hämoglobin	4	50,0	4	50,0	8	100
Mucin	4	50,0	4	50,0	8	100
Nekrose	14	58,3	10	41,7	24	100
Triglyzeride	4	50,0	4	50,0	8	100
Wasser-Anreicherung	8	50,0	8	50,0	16	100
Insgesamt	62	51,7	58	48,3	120	100

¹Alle Proben lieferten in den Experimenten mit Störsubstanzen das erwartete Ergebnis (MSS oder MSI-H).

12.7 Kreuzkontamination

Die Kreuzkontamination zwischen Proben im OncoMate® MSI Dx Analysis System wurde anhand von extrahierter DNA aus einer MSI-H-Probe und einer MSS-Probe evaluiert, wobei sowohl die Tumorprobe als auch die übereinstimmende Normalprobe berücksichtigt wurden. Die Proben und die Reagenzien-Blindproben wurden in einem Rastermuster auf den 96-Well-Platten verteilt. Mit diesem Plattenlayout wurden die Amplifikation, die Kapillarelektrophorese und die Analyse an insgesamt 10 Tagen täglich durchgeführt. Zu den erwarteten Ergebnissen zählten „MSI-H“, „MSS“ und ungültige Testergebnisse. Das ungültige Testergebnis wurde für die Reagenzien-Blindproben erwartet. Die Ergebnisse wurden nicht gemittelt und alle beobachteten Übertragungen wurden angegeben.

Bei den 470 analysierten Proben bestand eine 100%ige Konkordanz zwischen dem beobachteten Interpretationsergebnis und den erwarteten Ergebnissen, und es wurden keine Beeinträchtigungen bei der Dateninterpretation festgestellt. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass das OncoMate® MSI Dx Analysis System nicht anfällig für eine Kreuzkontamination zwischen Proben ist.

12.8 Reproduzierbarkeit

Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des OncoMate® MSI Dx Analysis System wurden anhand verschiedener Standorte, Bediener, Durchläufe, Tage, Replikaten und Chargen der Assay-Kits evaluiert. Die Daten wurden hinsichtlich der Wiederholbarkeit zwischen den Standorten, zwischen den Bedienern, zwischen den Durchläufen, zwischen den Tagen, innerhalb der Durchläufe sowie zwischen den Chargen sowie hinsichtlich der Genauigkeit bewertet.

Das Testpanel umfasste sieben CRC-Proben (vier MSI-H- und drei MSS-Fälle), eine negative Amplifikationskontrolle (Water, Amplification Grade) und eine positive Amplifikationskontrolle (2800M Control DNA). Zwei der MSI-H-Proben wurden durch Vermischen der aus der Tumorprobe extrahierten DNA mit übereinstimmender normaler DNA auf eine Tumormast von 20 % (den minimalen Tumorgehalt) angepasst. Die Proben wurden verblindet und an die Bediener an den einzelnen Teststandorten verteilt. Das Probenpanel wurde von jeweils zwei Bedienern an allen drei Standorten auf drei Geräten (eines pro Standort) getestet. Die drei Teststandorte waren zwei externe Standorte und ein interner Standort. Pro Probe wurden zwei Replikate mit drei Reagenzienchargen in zwei Durchläufen pro Tag an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet.

Die absoluten und relativen Häufigkeiten für das Interpretationsergebnis wurden nach Standort, Bediener, Tag, Charge und Replikat berechnet. Die Daten sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Die positiven prozentualen Übereinstimmungen (PPAs) für MSI-H-Interpretationsergebnisse und die negativen prozentualen Übereinstimmungen (NPAs) für MSS-Interpretationsergebnisse waren im Vergleich zu den erwarteten Ergebnissen (Tabelle 18) hinsichtlich Standort, Bediener, Tag, Charge, Durchlauf und Replikat reproduzierbar. Die PPAs für Standort, Bediener, Tag, Charge, Durchlauf und Replikat lagen im Bereich von 95,2–100 %; die NPAs betrugen durchweg 100 %, was die Reproduzierbarkeit für jeden getesteten Faktor zeigt. Die Gesamtproduzierbarkeit für PPA (95%-CI) und NPA (95%-CI) betrug 98,6 % (96,4–99,6 %) bzw. 100 % (98,3–100 %).

Alle Proben stimmten über alle Faktoren hinweg zu 100 % mit den erwarteten Ergebnissen überein und waren reproduzierbar, mit Ausnahme einer MSI-H-Probe, bei der die Übereinstimmung bei 93,8 % (60/64) lag. Diese Probe hatte einen der Mindestanforderung entsprechenden Tumorgehalt von 20 %. Acht der 72 erwarteten Ergebnisse für diese Probe wurden nicht in die Analyse einbezogen, da sie aufgrund eines schwachen Signals kein gültiges Ergebnis lieferten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie zeigte, dass das OncoMate® MSI Dx Analysis System und die Reagenzien zwischen und über verschiedene Standorte, Bediener, Tage, Chargen, Durchläufe und Replikate hinweg reproduzierbar sind.

Tabelle 17. Absolute und relative Häufigkeiten für das Interpretationsergebnis nach Standort, Bediener, Tag, Charge und Replikat.

		Referenzergebnis													
		MSI-H						MSS							
		MSI-H		MSS		Insgesamt		MSI-H		MSS		Insgesamt			
Interpretations- ergebnis		MSI-H		MSS		Insgesamt		MSI-H		MSS		Insgesamt		Gesamte analysierte Ergebnisse	Gesamte erwartete Ergebnisse
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Standort	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
Nutzer	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
Tag	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
Charge	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
Replikat	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
Insgesamt		276	98,6	4	1,4	280	100	0	0	214	100	214	100	494	504

Tabelle 18. Zusammenfassung der PPA und NPA für das Interpretationsergebnis im Vergleich zum Referenzergebnis.

Interpretationsergebnis		PPA		NPA	
		Beobachtete/erwartete MSI-H		Beobachtete/erwartete MSS	
		% (#/n)	95%-CI	% (#/n)	95%-CI
Standort	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]
Nutzer	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]
Tag	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]
Charge	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]
Lauf	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]
Replikat	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]
Insgesamt		98,6 % (276/280)	[96,4; 99,6]	100 % (214/214)	[98,3; 100]

12.9 Bewertung der Konkordanz zwischen Datenanalysemethoden

Es wurde eine Konkordanzstudie durchgeführt, um die im *Technischen Handbuch zum OncoMate® MSI Dx Analysis System* Nr. TM595 beschriebene Datenanalysemethode für den Einsatz in Europa mit der Software zu vergleichen, die in den analytischen und klinischen Studien zum OncoMate® MSI Dx Analysis System verwendet wurde.

Übereinstimmende Tumor- und Normal-DNA-Proben von 84 CRC-Fällen wurden mithilfe des OncoMate® MSI Dx Analysis System getestet. Die mit einem Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer erzeugten Rohdatendateien wurden hinsichtlich des MSI-Status mit beiden Analysemethoden analysiert und interpretiert. Dabei wurden die in den jeweiligen Anleitungen beschriebenen Verfahren befolgt. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Konkordanz der Interpretationen zwischen den Methoden quantitativ bewertet, indem die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA), die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) und die prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) berechnet wurden. Als Akzeptanzkriterium wurde eine OPA von $\geq 95\%$ verwendet.

Es wurde mit einer prozentualen Gesamtübereinstimmung von 100 % nachgewiesen, dass die beiden Datenanalysemethoden gleichwertig sind. Die gemäß den Anweisungen im *Technischen Handbuch zum OncoMate® MSI Dx Analysis System* Nr. TM595 erzeugten MSI-Interpretationsergebnisse entsprechen den Ergebnissen, die mit der Software mit eingeschränkter Verteilung erzielt wurden, die für analytische und klinische Studien verwendet wurde. In den Tabellen 19 und 20 sind die Konkordanzergebnisse und die Übereinstimmung zusammengefasst. Diese Ergebnisse wurden mit der im *Technischen Handbuch zum OncoMate® MSI Dx Analysis System* Nr. TM595 beschriebenen Analysemethode ermittelt, nicht mit der Software mit eingeschränkter Verteilung, die für analytische und klinische Studien verwendet wurde.

Tabelle 19. Bewertung der Konkordanz zwischen MSI-Ergebnissen.

		Interpretationssoftware mit eingeschränkter Verteilung			
		MSI-H	MSS	Ungültig	Insgesamt
GeneMapper® 5.0*	MSI-H	43	0	0	43
	MSS	0	41	0	41
	Ungültig	0	0	0	0
	Insgesamt	43	41	0	

*Die Datenanalyse erfolgte wie im *Technischen Handbuch zum OncoMate® MSI Dx Analysis System* Nr. TM595 beschrieben.

Tabelle 20. Bewertung der Konkordanz zwischen MSI-Ergebnissen mit GeneMapper® 5.0 oder Software mit eingeschränkter Verteilung.

	Schätzung	Unterer Grenzwert ≥ 95%-CI	Oberer Grenzwert ≥ 95%-CI
PPA	100 %	91,8 %	100 %
NPA	100 %	91,4 %	100 %
OPA	100 %	95,6 %	100 %

Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA), negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) und prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA).

13. Klinische Leistung

Das Hauptziel der klinischen Leistungsbewertung bestand darin, die Leistung des OncoMate® MSI Dx Analysis System bei der Identifizierung von Mikrosatelliten-Instabilität im klinischen Umfeld im Vergleich zu einer anderen Methode auf dem neuesten Stand der Technik nachzuweisen. Es wurde ein Methodenvergleich zwischen dem OncoMate® MSI Dx Analysis System und dem VENTANA™ MMR IHC Panel durchgeführt, mit dem das Vorhandensein bzw. Fehlen von DNA-Mismatch-Reparaturproteinen durch Färbung nachgewiesen wird.

Die Studie wurde durchgeführt, indem eine sequenzielle Reihe von insgesamt 146 Proben von Patienten mit kolorektalem Karzinom getestet wurde. Die Proben wurden mit einem zweiten Satz von Proben angereichert, bei denen Verdacht auf das Lynch-Syndrom bestand. Übereinstimmende Normal- und Tumor-DNA-Proben von 146 Fällen von kolorektalem Karzinom (CRC) mit unbekanntem MSI-Status wurden randomisiert und anschließend mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System analysiert. Proben-Curls von FFPE-Gewebeblöcken wurden zur Durchführung von Immunhistochemie an ein externes Labor gegeben. An allen 146 Tumorproben wurde Immunhistochemie durchgeführt, um mit dem VENTANA™ MMR IHC Panel gemäß der VENTANA™ Gebrauchsanweisung und den Standardarbeitsanweisungen des Labors die Proteinexpression der MLH1-, MSH2-, MSH6-, PMS2- und BRAF-Gene an den bereitgestellten Proben-Curls zu bestimmen.

13.1 Ergebnisse des OncoMate® MSI Dx Analysis System im Vergleich zu IHC-Ergebnissen

Die Ergebnisse des Vergleichs des OncoMate® MSI Dx Analysis System und des VENTANA IHC MMR Panel für die 146 Proben sind in Tabelle 17 aufgeführt. Insgesamt wurden 106 Proben mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System als „MSS“ eingestuft und als „MMR intakt“ für alle vier MMR-Proteine mit dem VENTANA IHC MMR Panel. 37 Proben wiesen ein Verlust der IHC-Färbung für mindestens eines der vier MMR-Proteine auf (dMMR). Von diesen 37 Proben wurden 36 Proben vom OncoMate® MSI Dx Analysis System als MSI-H eingestuft. Bei 23 Proben bestand aufgrund der IHC (Verlust der MMR-Proteinexpression und Wildtyp-BRAF) sowie der mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System ermittelten MSI-H der Verdacht auf Lynch-Syndrom. 13 Proben wurden mit dem OncoMate® MSI Dx Analysis System als MSI-H eingestuft und wiesen einen Verlust der MLH1- und PMS2-Proteinexpression auf. Diese Proben wiesen eine BRAF-V600E-Mutation auf, was einer sporadischen Mutation entspricht. Eine Probe war MSS, zeigte jedoch einen Verlust sowohl von MLH1 als auch von PMS2, ohne Anzeichen einer BRAF-V600E-Mutation.

Drei Proben wurden vom OncoMate® MSI Dx Analysis System als MSI-H eingestuft, wurden jedoch für alle vier MMR-Proteine als „intakte IHC-Färbung“ eingestuft. In der Fachliteratur wird für einen IHC-Status von intakter MMR mit MSI-H eine Rate von 5–10 % berichtet (16). Dies lässt sich vermutlich auf ein nicht funktionstüchtiges MMR-Protein zurückführen, das weiterhin Epitop-Bindungsstellen aufweist (d. h., weiterhin eine Kreuzreaktivität mit dem Antikörper aufweist). Die hier zusammengestellten Studienergebnisse stimmen mit den in der Fachliteratur berichteten Ergebnissen überein (16). Die Daten sind in den Tabellen 21 und 22 zusammengefasst.

Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) betrug 97,3 % und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) 97,2 %, wobei die prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) zwischen den beiden Methoden 97,3 % betrug. Das OncoMate® MSI Dx Analysis System hat Tumoren mit MMR-Defizienz effektiv identifiziert und weist eine hohe Übereinstimmung mit dem VENTANA MMR IHC Panel auf.

Tabelle 21. Vergleich der Interpretationsergebnisse des OncoMate® MSI Dx Analysis System mit denen der IHC (MMR: Verlust/intakt).

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

Tabelle 22. Vergleich der Interpretationsergebnisse des OncoMate® MSI Dx Analysis System mit denen der IHC (MMR: Verlust/intakt): Messungen der Übereinstimmung.

OncoMate® MSI Dx Analysis System im Vergleich zu IHC	Schätzung	Unteres 95-%-CI	Oberes 95-%-CI
PPA	97,3	86,2	99,5
NPA	97,2	92,2	99,1
OPA	97,3	93,2	98,9

14. Änderungsübersicht

1. Zur Einhaltung der IVDR aktualisiert.
2. Trademark-Symbol für OncoMate durch Symbol für eingetragene Marke ersetzt.
3. Abschnitt 10, Literaturangabe bearbeitet.
4. Symbol für Bevollmächtigten aktualisiert.
5. Deckblattgrafik ausgetauscht und Schriftart des Dokuments aktualisiert.

TM595 Revisionsdatum: 07.26

Version: Rev2

^(a)U.S. Pat. Nrn. 7,749,706 und 7,902,343

^(b)US-Pat. Nr. 9,139,868, Europäisches Pat. Nr. 2972229 und andere angemeldete Patente.

^(c)Die Farbstoffe TMR-ET, CXR-ET und WEN sind urheberrechtlich geschützt.

©2019–2026 Promega Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

GoTaq, Maxwell, OncoMate und QuantiFluor sind eingetragene Marken der Promega Corporation.

Applied Biosystems, GeneMapper und Veriti sind eingetragene Marken von Applied Biosystems. C1000 Touch ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. MasterCycler ist eine eingetragene Marke von Eppendorf. Hi-Di ist eine Marke der Applera Corporation. MicroAmp und POP-7 sind eingetragene Marken von Thermo Fisher Scientific.

Die Produkte können angemeldeten oder erteilten Patenten oder bestimmten Einschränkungen unterliegen. Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website. Alle Preise und technischen Daten können ohne vorherige Ankündigung geändert werden.

Änderungen zu Produktansprüchen bleiben vorbehalten. Wenden Sie sich an Promega Technical Services oder rufen Sie den Online-Katalog von Promega auf, um die aktuellen Informationen zu Promega-Produkten zu erhalten.