

MANUAL TÉCNICO

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

Instrucciones de uso del producto
MD3140



INSTRUCCIONES DE
USO DEL PRODUCTO
MD3140



Rev. 0
TM595


PROMEGA
2800 Woods Hollow Rd.
Madison, WI USA

EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Alemania

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1.	Introducción.....	3
1.1	Descripción general del OncoMate™ MSI Dx Analysis System	3
1.2	Nombre del producto.....	4
1.3	Abreviaturas y definiciones.....	5
1.4	Descripción de los símbolos utilizados.....	6
1.5	Uso previsto	7
1.6	Información general	8
1.7	Principio de la prueba	9
2.	Componentes del producto y condiciones de almacenamiento.....	13
2.1	Materiales proporcionados con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System (n.º de cat. MD3140)	13
2.2	Almacenamiento y manipulación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System	14
2.3	Materiales no proporcionados	14
3.	Antes de empezar	16
3.1	Advertencias y precauciones	16
3.2	Requisitos de las muestras.....	17
3.3	Métodos de extracción de ADN y requisitos de calidad del ADN.....	17
3.4	Requisitos de cantidad del ADN	17
3.5	Requisitos del termociclador	18
3.6	Requisitos del instrumento de electroforesis capilar	18
3.7	Requisitos de calibración espectral para el instrumento de electroforesis capilar	19
3.8	Requisitos del software de análisis de datos	19
3.9	Requisitos de los umbrales analíticos	19
4.	Protocolo de análisis	20
4.1	Dilución de los extractos de ADN de tejidos FFPE	20
4.2	Dilución del 2800M Control DNA	21
4.3	Preparación de las reacciones de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System	22
4.4	Ciclo térmico.....	23
4.5	Preparación del instrumento de electroforesis capilar	24
4.6	Preparación de los fragmentos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System para la electroforesis capilar	24
4.7	Detección de fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar con detección por fluorescencia	25
5.	Análisis de los datos	26
5.1	Introducción	26
5.2	Análisis de datos.....	28

6.	Revisión e interpretación de los resultados.....	30
6.1	Interpretación de los datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.....	31
6.2	Resumen de anomalías de electroforesis capilar y artefactos de amplificación conocidos	33
6.3	Requisitos de control de calidad para la interpretación de los datos	34
6.4	Determinación de la estabilidad de los marcadores de repetición de mononucleótidos	43
6.5	Interpretación del estado de MSI del tumor	46
7.	Controles de calidad de los análisis.....	51
7.1	Calibración espectral	51
7.2	Muestra de tejido normal emparejada	51
7.3	Controles positivos y negativos	51
7.4	Estándares de electroforesis capilar	52
7.5	Umbral analítico.....	52
8.	Limitaciones específicas.....	53
9.	Solución de problemas	54
10.	Bibliografía	62
11.	Información adicional	64
11.1	Apéndice A.....	64
11.2	Apéndice B.....	65
11.3	Apéndice C.....	69

1. Introducción

1.1 Descripción general del OncoMate™ MSI Dx Analysis System

En esta guía se describe el OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Se trata de la fuente principal de información sobre su uso previsto, componentes, limitaciones, protocolo y resolución de problemas, entre otros aspectos. El OncoMate™ MSI Dx Analysis System es un producto sanitario para IVD con la marca CE que emplea un análisis fluorescente basado en PCR como parte de un flujo de trabajo de laboratorio más amplio (figura 1) para analizar muestras de tejido fijadas mediante formalina e incrustadas en parafina (FFPE) con el fin de determinar la inestabilidad de microsatélites (MSI).

 El OncoMate™ 5C Matrix Standard (n.º de cat. MD3850) es necesario para el análisis de los productos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System por electroforesis capilar. Las instrucciones de uso del OncoMate™ 5C Matrix Standard se encuentran en el *manual técnico del OncoMate™ 5C Matrix Standard* (n.º TM597).

El flujo de trabajo completo en torno al uso del OncoMate™ MSI Dx Analysis System incluye la extracción de ADN de una muestra de tejido FFPE, la cuantificación del ADN, la amplificación de marcadores microsatélites específicos mediante PCR multiplex, el análisis de fragmentos de ADN amplificado por electroforesis capilar y el análisis de datos de fragmentos de electroforesis capilar a través de un software de análisis de fragmentos. Los usuarios del OncoMate™ MSI Dx Analysis System deben seleccionar los componentes de flujo de trabajo adecuados según los requisitos establecidos en la sección 3. Consulte la documentación técnica del método de extracción de ADN, el método de cuantificación de ADN, el termociclador, el instrumento de electroforesis capilar y el software de análisis de fragmentos que elija para obtener más información.



Aislar ADN.



Cuantificar ADN.

Reactivos de cuantificación de ADN fluorescente, instrumentos o ambos (consulte la sección 1.7)



Amplificar ADN.

OncoMate™ MSI Dx Analysis System (n.º de cat. MD3140, TM595)

Termociclador capaz de aumentar 3,9-5 °C por segundo



Calibrar espectro de colorantes.

OncoMate™ 5C Matrix Standards (n.º de cat. MD3850, TM597)



Separar y detectar.

Applied Biosystem® 35 Dx Genetic Analyzer o
instrumento de electroforesis capilar comparable



Analizar e interpretar datos.

Software de análisis de fragmentos

1520718

Figura 1. Flujo de trabajo de laboratorio asociado con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

1.2 Nombre del producto

OncoMate™ MSI Dx Analysis System

N.º de cat. MD3140, 100 reacciones



1.3 Abreviaturas y definiciones

bp: par de bases.

CRC: cáncer colorrectal.

DCS: software de recopilación de datos.

dMMR: reparación deficiente de los errores de emparejamiento.

dsDNA: ADN bicatenario.

ESMO: Sociedad Europea de Oncología Médica.

FFPE: fijado mediante formalina e incrustado en parafina.

HNPCC: cáncer colorrectal hereditario no polipósico.

ICI: inhibidor de los puntos de control inmunitario.

LOH: pérdida de heterocigosidad.

MMR: reparación de los errores de emparejamiento.

MSI: inestabilidad de microsatélites.

MSI-H: alta inestabilidad de microsatélites (resultado interpretativo de la muestra cuando dos o más marcadores son inestables).

MSS: estabilidad de microsatélites (resultado interpretativo de la muestra cuando menos de dos marcadores son inestables).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RFU: unidades de fluorescencia relativa.

QC: control de calidad.

NA: no aplicable.

Alelo: una de dos o más formas (por ejemplo, longitud) de un marcador de ADN.

Exceso de traspaso: artefacto de electroforesis capilar en el que se detectan picos de un canal de colorante en un segundo canal de colorante de aproximadamente el mismo tamaño (bp).

Marcador de ADN: una secuencia de interés dentro del genoma.

Heterocigoto: los alelos de un marcador de ADN tienen diferentes formas.

Homocigoto: ambos alelos de un marcador de ADN tienen la misma forma.

Repetición de mononucleótidos: estructura del ADN donde se repite la misma base de nucleótidos.

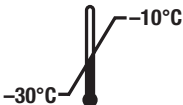
Cuasimonomórfico: un marcador de ADN para el cual la mayoría de los individuos son homocigóticos en relación con el mismo alelo común.

Estable: no hay cambios en el tamaño del alelo que indiquen una deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento.

Pico de artefacto: un artefacto de PCR producto del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación de ADN in vitro. Los picos de artefactos son una o más unidades de repetición más cortas o largas que el pico real del alelo.

Inestable: hay cambios en el tamaño del alelo que indican una deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento.

1.4 Descripción de los símbolos utilizados

Símbolo	Explicación	Símbolo	Explicación
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Se debe almacenar a temperaturas de entre -30 °C y -10 °C		Fabricante
	Conformidad europea		Irritante
	Número de catálogo		Código de lote
	No reutilizar		Válido para “n” pruebas
	Fecha de caducidad		Proteger de la luz
	Consulte las instrucciones de uso		

1.5 Uso previsto

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System es una prueba de dimensionado de fragmentos basada en PCR que se utiliza para determinar el estado de inestabilidad de microsatélites (MSI) en ADN purificado a partir de muestras de tejido humano fijadas mediante formalina e incrustadas en parafina (FFPE) obtenidas de tumores sólidos.

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System genera perfiles alélicos a partir de las muestras de tejido FFPE tumoral y no tumoral del mismo paciente mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de marcadores microsatélites de ADN, seguida de la separación por tamaño de los marcadores amplificados a través de electroforesis capilar. Para determinar el estado de MSI, se comparan los perfiles alélicos. Una expansión o reducción en la longitud de las secuencias repetitivas de ADN en el ADN de las células tumorales en comparación con el ADN de las células normales del mismo paciente indica MSI. El tejido normal y el tumoral del mismo paciente deben analizarse a la vez y los datos de ambas muestras deben estar disponibles para su comparación a fin de que los resultados sean válidos.

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System no está diseñado para diagnosticar una enfermedad específica. Se ha ideado para utilizarse con pacientes ya diagnosticados con cáncer para los que pueda resultar beneficiosa la realización de pruebas genéticas adicionales. Los profesionales sanitarios son quienes deben interpretar los resultados de las pruebas obtenidos con el producto, junto con otros signos clínicos, antecedentes familiares y datos de laboratorio. Este producto está concebido solo para uso profesional.

1.6 Información general

Los microsatélites son secuencias de ADN cortas y repetitivas que se componen de unidades de repetición de uno a seis nucleótidos; por ejemplo, $(A)_n$, $(CA)_n$ o $(AAAAG)_n$. Las secuencias de microsatélites se distribuyen por todo el genoma humano y son propensas a errores de inserción y eliminación durante la replicación del ADN. Normalmente, el sistema de reparación de los errores de emparejamiento (MMR) de ADN celular corrige los errores. La MSI se observa cuando la función de la MMR es deficiente y no se reparan los errores de replicación del ADN, lo que da lugar a diferentes longitudes de alelos microsatélites en las muestras de tejido con MMR deficiente frente a las de tejido normal (Bacher, 2004; Boland, 2010; Ionov, 1993; Umar, 2004; Wang, 2017). Entre los microsatélites, las repeticiones de mononucleótidos son las que tienen más probabilidades de mostrar inestabilidad (Bacher, 2004; Ionov, 1993). La inestabilidad de microsatélites puede deberse a varios mecanismos subyacentes, como la mutación somática y germinal de genes de MMR, y las alteraciones en las regiones promotoras de genes de MMR. En los individuos con defectos de MMR, la acumulación de mutaciones puede provocar disfunción celular y, en última instancia, cáncer (Boland, 2010; Le, 2015; Timmermann, 2010).

La inestabilidad de microsatélites tiene mucha correlación con el síndrome de Lynch. Este síndrome es un trastorno autosómico dominante derivado de la mutación germinal de cualquiera de los cuatro genes de MMR principales (MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2) y presenta predisposición al cáncer. La identificación de individuos con síndrome de Lynch posibilita una detección e intervención tempranas del cáncer en un punto de la enfermedad en el que puede influirse más fácilmente en el índice de supervivencia. A nivel del genoma, el fallo de un gen de MMR conlleva una pérdida de expresión o efectividad de la proteína de MMR correspondiente. La inestabilidad de microsatélites se debe a una MMR deficiente y, por lo tanto, indica, junto con los antecedentes familiares y clínicos, una susceptibilidad genética subyacente. Entre los cánceres comunes asociados al síndrome de Lynch, se encuentran el cáncer colorrectal y el endometrial; sin embargo, el síndrome de Lynch se ha identificado en prácticamente todos los tipos de tumores sólidos (Cortés-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018). Varias asociaciones de oncología clínica respaldan el cribado universal del cáncer colorrectal y el endometrial en busca de MSI con el fin de identificar candidatos para la realización de pruebas genéticas adicionales sobre el síndrome de Lynch, incluida la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO; Stjepanovic, 2019), la Red Nacional de Centros Oncológicos Integrales (CRC, EC) y la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (Sepúlveda, 2017; Stoffel, 2015).

Más recientemente, la inestabilidad de microsatélites se ha asociado con la respuesta a la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) (Le, 2015; Overman, 2017). Las terapias con ICI se dirigen a los receptores de inmunosupresión o sus ligandos y, con el tratamiento, las células inmunitarias de un individuo son más eficaces a la hora de combatir el cáncer. Debido a la función defectuosa de la MMR del ADN, los tumores con una alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) hipermutan y producen más neoantígenos o nuevos epítomos, algunos de los cuales se cree que son inmunógenos y desencadenan una respuesta inmunitaria contra el cáncer (Le, 2017). Como resultado, los tumores MSI-H suelen ser antigénicos y muestran una mayor infiltración de linfocitos, un escenario en el que es probable que el paciente responda a un ICI. La identificación de los pacientes que podrían beneficiarse de estos tratamientos brinda información y opciones adicionales a los profesionales sanitarios. Se ha observado MSI en muchos tipos de tumores (Cortés-Ciriano, 2018; Hause, 2016; Latham, 2018) y se ha demostrado la respuesta a ICI en los tumores MSI-H desde varios puntos de origen (Le, 2015). La Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) ha reconocido la importancia de las pruebas de MSI y deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento para respaldar la idoneidad de los pacientes en cuanto a las terapias con ICI y ha resumido sus recomendaciones sobre las pruebas de MSI con este fin (Luchini, 2019; Stjepanovic, 2019). El grupo de trabajo de investigación traslacional y medicina de precisión de la ESMO recomienda las pruebas de MSI en el espectro de los tumores relacionados con el síndrome de Lynch debido a la posible utilidad de los ICI en estos cánceres; asimismo, la identificación de dicho síndrome puede beneficiar a más familiares. Se recomienda el uso conjunto de los análisis de MSI mediante PCR y dMMR mediante IHC como consecuencia de los informes anteriores de altas tasas de falsos positivos con las pruebas desarrolladas en laboratorios locales. Por último, el comité recomienda paneles de cinco marcadores de repetición de mononucleótidos por su mayor sensibilidad y especificidad con respecto a los paneles que incluyen marcadores de repetición dinucleótida (Luchini, 2019).

1.7 Principio de la prueba

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System permite llevar a cabo una prueba fluorescente y basada en PCR multiplex para detectar cambios de longitud de las secuencias de ADN en regiones microsatélites del ADN de las células tumorales en relación con las mismas regiones de las células normales del paciente. El OncoMate™ MSI Dx Analysis System tiene como objetivo siete marcadores microsatélites: cinco marcadores de repetición de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y dos marcadores de repetición de pentanucleótidos (Penta C y Penta D; tabla 1, figura 2). Estos marcadores de repetición de mononucleótidos se analizan para determinar el estado de la MSI y se han seleccionado por su alta sensibilidad y especificidad ante las alteraciones en las longitudes de repetición de las muestras que contienen defectos de reparación de los errores de emparejamiento. Por cada uno de los cinco marcadores de repetición de mononucleótidos, se compara el tamaño de los alelos (en par de bases, bp) de la muestra tumoral con los de la muestra normal para determinar si hay un nuevo alelo que represente MSI (figura 3). Un marcador se interpreta como inestable cuando se detecta un nuevo alelo con una diferencia de tamaño de al menos 2,75 bp (3 bases menos 0,25 pares de bases para ajustar la precisión de dimensionado de la electroforesis capilar) con respecto al alelo de referencia de la muestra normal. Una muestra tumoral se considera MSI-H cuando dos o más marcadores se interpretan como inestables. Una muestra tumoral se considera MSS cuando menos de dos marcadores se interpretan como inestables (Hampel, 2008; Boland, 1998). Aunque estos marcadores son cuasimonomórficos (es decir, la mayoría de los individuos son homocigóticos en relación con los mismos alelos comunes) y el tejido normal, por lo general, presentará una sola distribución de picos en cada marcador mononucleótido, se ha observado heterocigosidad de baja frecuencia o variación en la longitud del alelo del tejido normal entre los individuos.

Debido a la posibilidad de heterocigosidad, los datos de las muestras normales y de CRC emparejadas deben interpretarse conjuntamente para determinar el estado de MSI del tumor. Se analizan dos marcadores de repetición de pentanucleótidos como confirmación de identidad entre las muestras de ADN normal y tumoral, y se seleccionan por su alto nivel de polimorfismo y menor grado de MSI (Bacher, 2004). Cuando todos los alelos detectados en la muestra normal también se encuentran en la muestra tumoral, se respalda la identidad de las muestras.

Tabla 1. Canales de detección y rangos de tamaños amplificados previstos para los marcadores incluidos en el OncoMate™ MSI Dx Analysis System Amplification Kit. Los rangos corresponden a los tamaños esperados de los datos generados mediante el POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm.

Marcadores mononucleótidos	Estructura de repetición	Canal de detección	Rango de tamaño amplificado
BAT-26	A ₍₂₆₎	Azul	De 83 a 121 bp
NR-21	A ₍₂₁₎	Verde	De 83 a 108 bp
BAT-25	A ₍₂₅₎	Verde	De 110 a 132 bp
MONO-27	A ₍₂₇₎	Verde	De 134 a 168 bp
NR-24	A ₍₂₄₎	Amarillo (mostrado en negro)	De 103 a 138 bp
Marcadores pentanucleótidos	Estructura de repetición	Canal de detección	Rango de tamaño amplificado
Penta D	AAAGA ₍₂₋₁₇₎	Azul	De 123 a 253 bp
Penta C	AAAAC ₍₄₋₁₇₎	Amarillo (mostrado en negro)	De 140 a 228 bp

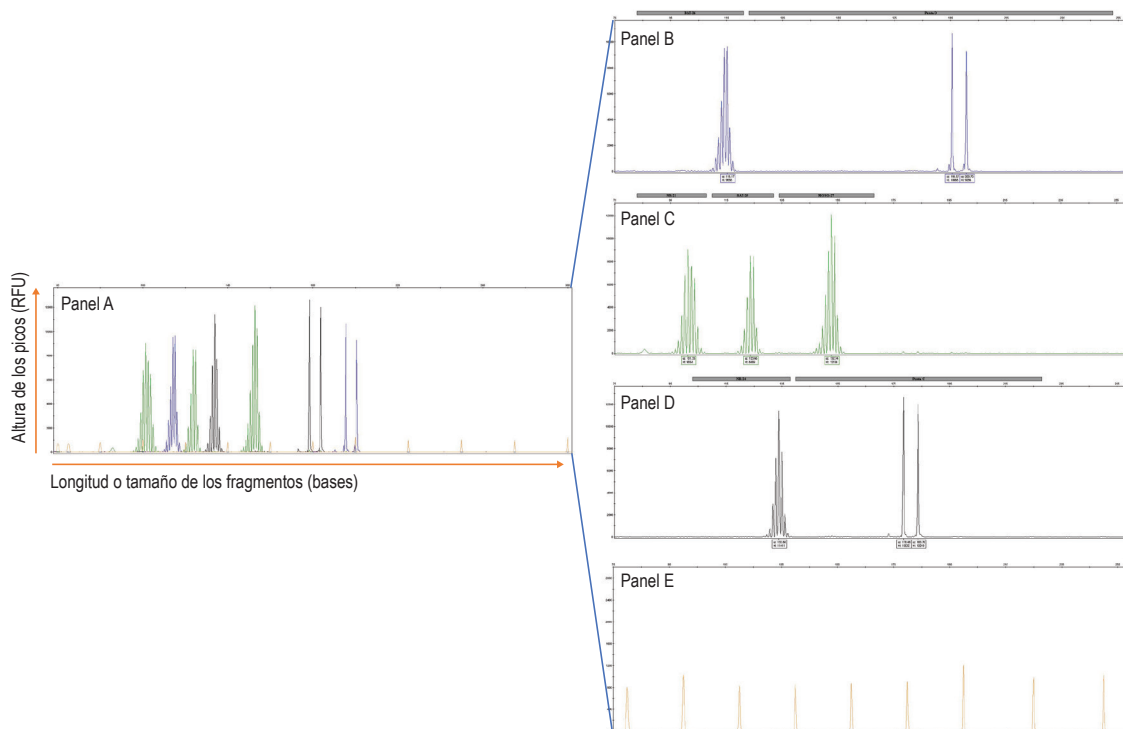
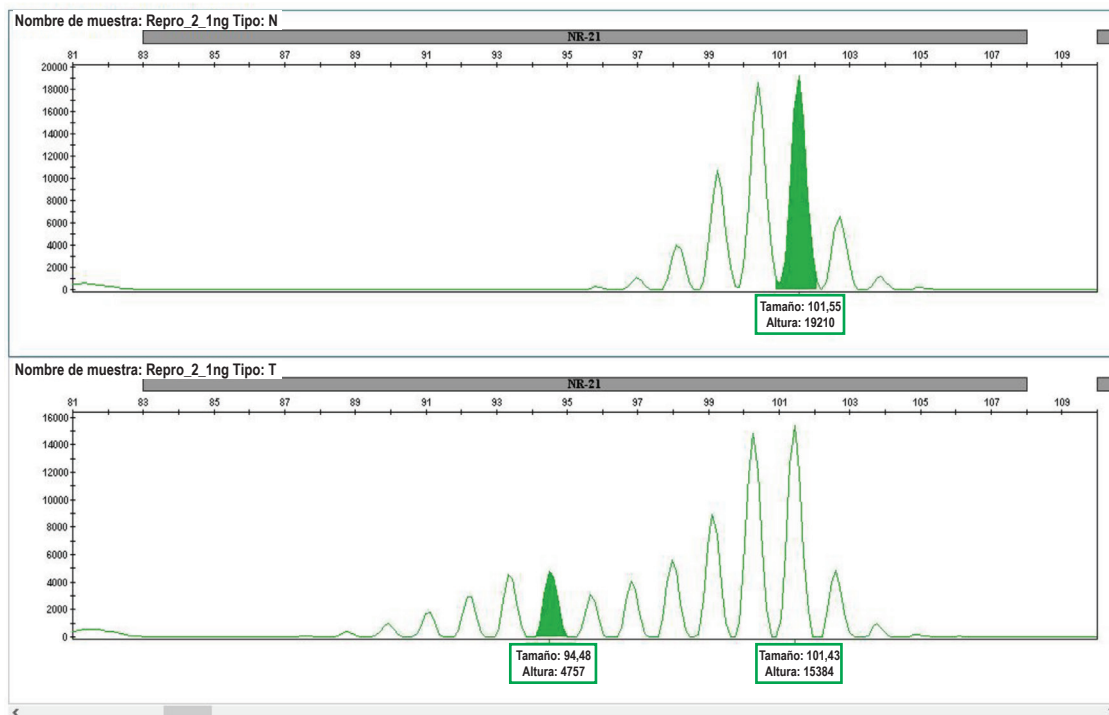


Figura 2. Ejemplo de datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Se amplificó una sola plantilla de ADN genómico (1 ng) con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System, y se analizaron los productos de PCR mediante el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con el POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm. **Panel A.** Un electroferograma que muestra la detección simultánea de todos los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia. **Paneles B-E.** Datos de microsatélites mostrados por canal de detección, lo que permite una interpretación más sencilla. En el panel E se ilustran los picos de fragmento del Size Standard 500.



16114TA

Figura 3. Evaluación de la estabilidad de los marcadores mononucleótidos. En el ejemplo anterior, aparecen resaltados los alelos microsatélites de interés. En el caso de un marcador mononucleótido, si la diferencia de tamaño entre el nuevo alelo de la muestra tumoral y el alelo de referencia de la muestra normal es de al menos 2,75 bp, el marcador se interpreta como inestable. En este ejemplo, el alelo de referencia de la muestra normal (electroferograma superior) es de 101,55 bp, mientras que el nuevo alelo de la muestra tumoral (electroferograma inferior) es de 94,48 bp. La diferencia de tamaño entre estos dos alelos es de 7,07 bp; esta diferencia es $\geq 2,75$ bp, por consiguiente, el marcador NR-21 se interpreta como inestable.

Mediante la PCR multiplex con cebadores marcados con colorante fluorescente, se amplifican las siete regiones microsatélites dentro de la misma reacción para generar productos de PCR marcados con colorante. Después, los productos de PCR y un estándar de tamaño marcado con fluorescencia, el Size Standard 500, se añaden a la formamida y se desnaturalizan por calor. El ADN monocatenario resultante se inyecta electrocinéticamente en un instrumento de electroforesis capilar, donde los fragmentos de ADN se separan en función del tamaño y se detectan mediante la etiqueta fluorescente incorporada. El análisis del estándar de tamaño junto con los fragmentos de ADN de microsatélites permite un dimensionado preciso y comparaciones directas de tamaño entre las muestras. Después de la electroforesis capilar, los archivos de datos de los fragmentos de ADN resultantes (.fsa) generados por el instrumento pueden analizarse mediante un software de análisis de fragmentos para determinar el tamaño de los fragmentos e identificar los alelos.

2. Componentes del producto y condiciones de almacenamiento

2.1 Materiales proporcionados con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System (n.º de cat. MD3140)

Este producto contiene suficientes reactivos como para realizar 100 reacciones (50 reacciones emparejadas).

Vienen incluidos los siguientes materiales:

COMPONENTE	TAMAÑO	N.º DE REFERENCIA
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	200 µl	MD705A

Incluye: cebadores con y sin marcado de fluoróforo para BAT-26, Penta D, NR-21, BAT-25, MONO-27, NR-24 y Penta C en una solución tamponada.

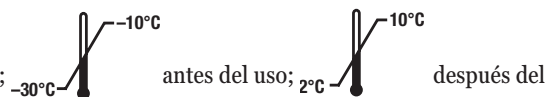
Condiciones de almacenamiento: área de preamplificación; primer uso. Proteger de la luz.



COMPONENTE	TAMAÑO	N.º DE REFERENCIA
OncoMate™ MSI 5X Master Mix	200 µl	MD280A

Incluye: GoTaq® MDx Hot Start DNA Polymerase, dNTP, cloruro de magnesio y sales en una solución tamponada con estabilizadores.

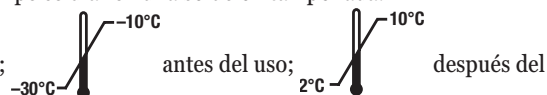
Condiciones de almacenamiento: área de preamplificación; primer uso.



COMPONENTE	TAMAÑO	N.º DE REFERENCIA
2800M Control DNA, 10 ng/µl	25 µl	MD810A

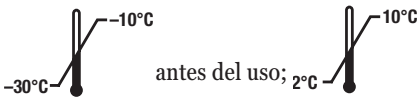
Incluye: estándar de ADN genómico masculino derivado de estirpe celular en una solución tamponada.

Condiciones de almacenamiento: área de preamplificación; primer uso.



COMPONENTE	TAMAÑO	N.º DE REFERENCIA
Water, Amplification Grade	1,25 ml	MD193A

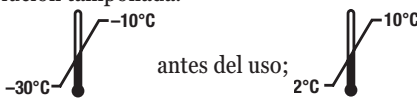
Condiciones de almacenamiento: área de preamplificación; primer uso.

Diagrama de almacenamiento:  antes del uso; después del

COMPONENTE	TAMAÑO	N.º DE REFERENCIA
Size Standard 500	100 µl	MD500A

Incluye: fragmentos de ADN marcados con fluoróforo en una solución tamponada.

 **Condiciones de almacenamiento:** área de posamplificación; del primer uso. Proteger de la luz.

Diagrama de almacenamiento:  antes del uso; después

2.2 Almacenamiento y manipulación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System

 Cuando reciba los componentes, almacénelos todos a una temperatura de entre -30 °C y -10 °C en un refrigerador sin No Frost. Antes del primer uso, guarde el 2800M Control DNA a una temperatura de 2 °C a 10 °C durante al menos 8 horas. Tras el primer uso, almacene el OncoMate™ MSI Dx Analysis System a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C durante 3 meses como máximo. La OncoMate™ MSI 5X Primer Mix y el Size Standard 500 son sensibles a la luz y deben guardarse en la oscuridad. No vuelva a congelar el producto. Almacene los reactivos de preamplificación y posamplificación en salas separadas y úselos con pipetas específicas, gradillas para tubos, etc. Es posible que los componentes guardados en condiciones distintas a las indicadas en las etiquetas no funcionen correctamente y afecten negativamente a los resultados.

2.3 Materiales no proporcionados

Reactivos de laboratorio

- Sistema de extracción de ADN (consultar secciones 3.3 y 3.4)
- OncoMate™ 5C Matrix Standard (n.º de cat. de Promega MD3850)
- Hi-Di™ Formamide (por ejemplo, Applied Biosystems n.º de cat. 4404307)
- Reactivos de cuantificación de dsDNA basados en colorante fluorescente (consultar sección 3.4)
- Agua sin nucleasa (n.º de cat. de Promega MC1191)

Nota: Es fundamental utilizar Hi-Di™ Formamide de alta calidad. Congele la Hi-Di™ Formamide en alícuotas a una temperatura de entre -30 °C y -10 °C. Múltiples ciclos de congelación-descongelación o el almacenamiento a largo plazo a 2-10 °C pueden provocar la descomposición de la formamida. La formamida de mala calidad puede contener iones que compiten con el ADN durante la inyección, lo que bajaría la altura de los picos y reduciría la sensibilidad.

Material de laboratorio

Nota: Se precisa del siguiente equipo en dos áreas distintas del laboratorio: una para los procedimientos de preamplificación y otra para los de posamplificación.

- Conjunto de pipetas de precisión calibradas capaces de administrar entre 1 µl y 1000 µl
- Puntas de pipetas resistentes a aerosoles (entre 10 µl y 1000 µl)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (n.º de cat. de Thermo Fisher Scientific 4306737)
- MicroAmp® 8-Cap Strip, transparente (n.º de cat. de Thermo Fisher Scientific N8010535) (solo preamplificación)
- Microcentrífuga personal (“minicentrífuga”)
- Centrífuga compatible con placas de 96 pocillos (por ejemplo, minicentrífuga de placas)
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Agitador vórtex
- Refrigerador sin No Frost a entre -30 °C y -10 °C
- Refrigerador a entre 2 °C y 10 °C
- Hielo picado (solo posamplificación)
- Equipo de extracción de ADN (por ejemplo, bloques calefactados, centrífugas...), según el método seleccionado (solo preamplificación)

Instrumentos y accesorios

- Instrumento de extracción de ADN (si el método es automatizado)
- Instrumento de cuantificación de ADN y materiales asociados
- Instrumento de electroforesis capilar y materiales asociados
- Termociclador compatible con placas de 96 pocillos

Software

- Software de análisis de fragmentos (es decir, software capaz de analizar archivos .fsa de un instrumento de electroforesis capilar)

3. Antes de empezar

3.1 Advertencias y precauciones



Advertencia de seguridad química: Algunos reactivos utilizados con el análisis de fragmentos son potencialmente peligrosos. Manipule y deseche los materiales peligrosos de acuerdo con las directrices que establezca su institución. La formamida es un irritante y teratógeno; se debe evitar la inhalación y el contacto con la piel. Lea la etiqueta de advertencia y tome las precauciones pertinentes cuando manipule esta sustancia. Utilice siempre guantes y gafas de seguridad cuando trabaje con formamida. Antes del uso, consulte la ficha técnica de seguridad de la formamida facilitada por el fabricante.

Declaración sobre la ficha técnica de seguridad: En la ficha técnica de seguridad (SDS) se incluye información importante sobre la manipulación, el transporte y la eliminación de seguros de este producto. Las SDS de todos los reactivos suministrados en los kits están disponibles en línea en www.promega.com/resources/msds/. También pueden solicitarse a los servicios técnicos de Promega a través de la dirección genetic@promega.com.

Precauciones de bioseguridad: El OncoMate™ MSI Dx Analysis System está diseñado para utilizarse con tejidos fijados mediante formalina e incrustados en parafina. Siga las directrices que establezca su institución en cuanto a la manipulación y eliminación de estos tejidos.

Precauciones sobre la PCR: La calidad del ADN purificado, los pequeños cambios en los tampones, la fuerza iónica, las concentraciones de los cebadores, el volumen de las reacciones, la elección del termociclador y las condiciones del ciclo térmico pueden afectar al éxito de la PCR. Por lo tanto, al usarse el OncoMate™ MSI Dx Analysis System, se deben seguir estrictamente los procedimientos recomendados para la amplificación y la detección por fluorescencia descritos en este manual.

Minimización de la contaminación: El análisis de microsatélites basado en PCR está sujeto a contaminación por cantidades muy pequeñas de ADN humano. Se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación cruzada al preparar la plantilla de ADN, manipular los componentes de los kits, ensamblar las reacciones de amplificación y analizar los productos de amplificación. Almacene y use los reactivos y materiales que se utilicen antes de la amplificación (OncoMate™ MSI 5X Master Mix, OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, 2800M Control DNA y Water, Amplification Grade) en una sala separada de las que se emplean después de la amplificación (Size Standard 500). Prepare las reacciones de amplificación en una sala específica para su configuración. Use equipos y materiales especializados para la configuración de la amplificación. Incluya siempre una reacción de control negativo (es decir, sin plantilla) para detectar la contaminación en los reactivos y una reacción de control positivo para verificar el rendimiento de los reactivos. Utilice guantes y puntas de pipeta resistentes a los aerosoles para evitar la contaminación cruzada.

3.2 Requisitos de las muestras

Las secciones de tejido aptas para utilizarse en el análisis se preparan con formalina tamponada neutra al 10 % siguiendo las prácticas estándares de patología e incluyen suficientes células nucleadas y un contenido tumoral con ≥ 20 % de células tumorales, según una evaluación de patología. La evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se llevó a cabo con ADN extraído mediante el Maxwell® CSC Instrument y el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit a partir de muestras de tejido FFPE de cáncer colorrectal que cumplían estos criterios.

3.3 Métodos de extracción de ADN y requisitos de calidad del ADN

La obtención de suficiente ADN de alta calidad a partir de tejidos fijados mediante formalina e incrustados en parafina (FFPE) puede ser problemática. El ADN puede degradarse debido a una fijación prolongada o inadecuada de la muestra de tejido antes de incrustarla en la parafina, y los inhibidores de amplificación de la muestra FFPE o el método de extracción pueden llevar a cabo el proceso de extracción. El usuario es el responsable de verificar la compatibilidad del método de purificación de ADN seleccionado con este análisis. Se pueden utilizar controles de análisis de PCR para identificar la presencia de inhibidores de amplificación en extractos de ADN purificado.

El rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se evaluó con ADN extraído a partir de muestras de tejido FFPE de cáncer colorrectal mediante el Maxwell® CSC DNA FFPE Kit (n.º de cat. AS1350) y el Maxwell® CSC Instrument (n.º de cat. AS6000). Se ha demostrado que la presencia de hasta un 5 % de etanol o hasta 50 μ m de cloruro de guanidinio en el ADN extraído no interfiere en el rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.4 Requisitos de cantidad del ADN

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System Amplification Kit está diseñado para utilizarse con 1 ng de ADN. El ADN debe cuantificarse antes de su uso. Las mediciones de absorción UV no son fiables para cuantificar el dsDNA purificado de muestras de tejido FFPE. Para estimar la concentración de ADN, se recomienda el uso de colorantes fluorescentes de ligadura de dsDNA o una PCR cuantitativa. Ambos métodos proporcionan una cuantificación más fiable del ADN purificado de muestras de tejido FFPE, en particular, cuando las concentraciones de ADN son bajas o cuando los eluidos de ADN contienen contaminantes comunes (por ejemplo, RNA, nucleótidos libres, disolventes, detergentes, proteínas o sales).

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System se evaluó con muestras de ADN de CRC cuantificadas mediante colorantes de ligadura de dsDNA capaces de medir con precisión concentraciones de dsDNA de tan solo 0,05 ng/ μ l. Durante la evaluación del rendimiento, el ADN se cuantificó a través del QuantiFluor® dsDNA System (n.º de cat. E2670), destinado al uso general en laboratorio.

3.5 Requisitos del termociclador

El rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se evaluó con los termocicladores Thermo Fisher Scientific Veriti®, Eppendorf MasterCycler® y Bio-Rad C1000 Touch™, que comparten las siguientes especificaciones mínimas:

Tasa máxima de incremento en bloque: de 3,9 °C/segundo a 5 °C/segundo

Precisión de temperatura: $\pm 0,25$ °C (a ≥ 90 °C)

Uniformidad de temperatura: $< 0,5$ °C (a ≥ 90 °C)

Tapa calefactada capaz de alcanzar de 103 °C a 105 °C

El uso de termocicladores con especificaciones que se encuentran fuera de los rangos indicados puede afectar negativamente a los resultados de este análisis.

3.6 Requisitos del instrumento de electroforesis capilar

Los productos de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se separan según la longitud (tamaño) de los fragmentos mediante electroforesis capilar. A excepción de la selección de un conjunto de colorantes basado en el método AnyDye (Cualquier colorante) para la calibración espectral, se utilizó el método predeterminado Fragment Analysis (Análisis de fragmentos) proporcionado por el software de recopilación de datos para el análisis de fragmentos y se modificó el tiempo de inyección para alcanzar las alturas de picos de fragmentos adecuadas. En cuanto al 2800M Control DNA, se puso como objetivo una altura de pico de aproximadamente 8000 unidades de fluorescencia relativa (RFU) para los siete marcadores del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. El rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se evaluó mediante el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer configurado con el POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm. Las condiciones de análisis empleadas durante la evaluación del rendimiento figuran en el apéndice B (sección 11.2). Los instrumentos de electroforesis capilar compatibles con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System compartirán las siguientes especificaciones:

Número de colorantes detectados: ≥ 5

Longitud del conjunto de capilares: longitudes aptas para la distinción en una base, incluida la de 50 cm

Matriz de separación: POP-7® o equivalente

Longitud de onda de excitación (aproximada): entre 480 nm y 520 nm

Óptica de detección: los colorantes de Promega requieren una captura de emisión de entre 500 nm y 630 nm aproximadamente

Rango de distinción: distinción de 1 bp de entre 60 bp y ≥ 300 bp

Precisión de dimensionado (repetibilidad, expresada como desviación estándar): $\leq 0,15$ bp en un rango de entre 60 bp y ≥ 300 bp

El usuario es el responsable de verificar la compatibilidad del instrumento de electroforesis capilar y del método de análisis seleccionados con los productos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

3.7 Requisitos de calibración espectral para el instrumento de electroforesis capilar

Antes del primer uso, realice una calibración espectral del instrumento de electroforesis capilar con el OncoMate™ 5C Matrix Standard (n.º de cat. MD3850). Para llevar a cabo la calibración espectral, se debe seguir el *manual técnico del OncoMate™ 5C Matrix Standard* (n.º TM597) y consultar la guía de usuario del instrumento de electroforesis capilar. Este procedimiento proporciona los datos necesarios para que el instrumento de electroforesis capilar distinga las señales fluorescentes superpuestas de los distintos fragmentos de ADN marcados con colorante del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Los ajustes de calibración empleados durante la evaluación del rendimiento figuran en el apéndice A (sección 11.1). Efectúe una nueva calibración espectral de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del instrumento de electroforesis capilar. Por ejemplo, se requiere una nueva calibración espectral tras llevar a cabo cualquier proceso importante de mantenimiento en un sistema de electroforesis capilar, como cambiar el origen de la excitación (por ejemplo, láser), calibrar o sustituir la óptica, o modificar el tipo de polímero o el conjunto de capilares.

3.8 Requisitos del software de análisis de datos

Se precisa de un software de análisis de fragmentos para analizar los datos de la electroforesis capilar del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Un software adecuado de análisis de fragmentos deberá aceptar los archivos de datos de fragmentos (.fsa), calcular el tamaño de los fragmentos mediante el método de Southern local, atribuir fragmentos a un marcador según el rango de tamaño y la etiqueta fluorescente (es decir, color), colocar y mostrar en una tabla los datos de una combinación de tamaños (de ≥ 65 bp a 300 bp) y colores (≥ 5) de fragmentos, e imprimir y exportar los datos analizados de acuerdo con el marcador y el tamaño de los alelos que se calculen. Asimismo, deberá mostrar información sobre la calidad de los datos (por ejemplo, picos fuera de escala) capturados durante la electroforesis capilar y calcular unos parámetros de QC básicos (por ejemplo, identificación de picos amplios) en función de los ajustes definidos por el usuario.

Los datos generados durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se analizaron con el GeneMapper® Software (versión 5.0) y la configuración del método de análisis que aparece en el apéndice C (sección 11.3).

3.9 Requisitos de los umbrales analíticos

El usuario debe determinar el umbral analítico (es decir, de detección) del análisis antes de analizar los datos. El umbral analítico define el valor de RFU por encima del cual las señales de las muestras se pueden distinguir del ruido de los instrumentos, lo que permite al usuario analizar con confianza los datos de los fragmentos. La fijación de un umbral analítico reviste una importancia crucial para garantizar la calidad de los datos de los pacientes (consulte la sección 7.5). En la documentación técnica, se recogen procedimientos adecuados para determinar el umbral analítico (por ejemplo, Bregu, 2013). Durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System en el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer, se utilizó un umbral analítico de 175 RFU en todos los canales de colorante, determinado mediante el enfoque del límite superior, que se basa en la regresión lineal de los picos de intensidad generados a partir de muestras que contienen diferentes entradas de ADN (Bregu, 2013).

4. Protocolo de análisis

Mantenga los reactivos de preamplificación y posamplificación en salas separadas. Prepare las diluciones de las plantillas de ADN y las reacciones de amplificación en una sala específica para la configuración de estas últimas. Use equipos y materiales especializados para la configuración de la amplificación. Utilice guantes y puntas de pipeta resistentes a los aerosoles para evitar la contaminación cruzada del ADN. Emplee una punta de pipeta nueva al añadir cada muestra de ADN, el 2800M Control DNA y Water, Amplification Grade (para los controles negativos) a las reacciones de amplificación.

4.1 Dilución de los extractos de ADN de tejidos FFPE

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System requiere una entrada de dsDNA de 1,0 ng por reacción, administrada en un volumen de entre 1 µl y 6 µl. Se recomienda diluir el ADN con una concentración constante en todas las muestras para que se añada 1 ng de ADN a cada reacción en un volumen constante. Durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System, todas las plantillas de ADN se diluyeron en 0,5 ng/µl y se añadieron 2 µl de plantilla de ADN diluida a cada reacción.

Siga estos pasos para las muestras de ADN que deban diluirse antes de la amplificación:

1. Mezcle en vórtex la muestra de ADN tres veces durante 5 segundos cada una a máxima velocidad y centrifugue brevemente (de 1 a 2 segundos), si resulta necesario, en una minicentrífuga para recoger la muestra en el fondo del tubo.

Nota: Si no se mezclan adecuadamente las muestras y las diluciones de ADN, se pueden producir errores de cuantificación y un rendimiento deficiente del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

2. Diluya la muestra de ADN en agua sin nucleasa (n.º de cat. MC1191) en una concentración apropiada para permitir la adición de 1,0 ng de dsDNA a cada reacción de amplificación en el volumen deseado de la plantilla (consulte la sección 4.3). A fin de maximizar la precisión, pipetee volúmenes de ≥ 1 µl cuando diluya el ADN de muestra.

Nota: Utilice agua sin nucleasa si es necesario diluir la muestra. La eficiencia de la amplificación mediante PCR puede verse seriamente alterada por los cambios en el pH (debido a la adición de Tris-HCl) o la concentración de magnesio disponible (debido a la quelación por EDTA) en la reacción de amplificación cuando se usan diluyentes basados en Tris o Tris-EDTA. Si no se mezclan adecuadamente las muestras y las diluciones de ADN, se pueden producir errores de cuantificación y un rendimiento deficiente del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Prepare nuevas diluciones del ADN de muestra para cada experimento. El almacenamiento de ADN de muestra diluido para su posterior uso puede provocar una amplificación deficiente y fallos en el análisis.

4.2 Dilución del 2800M Control DNA

El 2800M Control DNA actúa como un control de amplificación positivo (sección 7.3), no como un control de MSI. El OncoMate™ MSI Dx Analysis System está diseñado para utilizarse con una entrada de 2800M Control DNA de 1,0 ng, administrada en un volumen de 1,0 µl a 6,0 µl. Antes de su uso, guarde el 2800M Control DNA, 10 ng/µl, a una temperatura de 2 °C a 10 °C durante al menos 8 horas. Se recomienda diluir el Control DNA en la misma concentración que las muestras de prueba. Durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx System, el 2800M Control DNA se diluyó en 0,5 ng/µl y se añadieron 2 µl de Control DNA diluido a cada reacción.

1. Mezcle en vórtex el 2800M Control DNA tres veces durante 10 segundos cada una a máxima velocidad.
2. Diluya el 2800M Control DNA en agua sin nucleasa (n.º de cat. MC1191) o Water, Amplification Grade, de modo que se añada 1,0 ng a la reacción de control positivo en el volumen deseado (1-6 µl). Consulte la tabla 2 para ver ejemplos de diluciones. A fin de garantizar la precisión, pipetee volúmenes de ≥1 µl cuando prepare las diluciones del 2800M Control DNA.

Tabla 2. Dilución del 2800M Control DNA.

Volumen de plantilla de ADN por reacción	Volumen de 2800M Control DNA (10 ng/µl)	Volumen de agua ¹
1,0 µl	2,0 µl	18 µl
2,0 µl	2,0 µl	38 µl
3,0 µl	2,0 µl	58 µl
4,0 µl	2,0 µl	78 µl
5,0 µl	2,0 µl	98 µl
6,0 µl	2,0 µl	118 µl

¹ Agua sin nucleasa o Water, Amplification Grade



Nota: Prepare una nueva dilución del 2800M Control DNA para cada experimento. El almacenamiento de 2800M Control DNA diluido para su posterior uso puede provocar una amplificación deficiente del control positivo y fallos en el análisis.

4.3 Preparación de las reacciones de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System

1. La primera vez que se utilicen, descongele por completo la OncoMate™ MSI 5X Primer Mix, la OncoMate™ MSI 5X Master Mix y el Water, Amplification Grade. Tras el primer uso, almacene los reactivos a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C durante 3 meses como máximo.
2. Centrifugue los tubos brevemente (1-2 segundos) en una minicentrífuga para llevar el contenido al fondo y mezcle en vórtex los reactivos tres veces durante 3 segundos cada una a máxima velocidad. No centrifugue después del mezclado en vórtex, ya que los reactivos podrían formar un gradiente de concentración en el tubo.
3. Etiquete una nueva MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode.
4. Determine el número de reacciones que deben ensamblarse. Se debe incluir al menos una reacción de control de amplificación positivo y otra de control de amplificación negativo por cada placa procesada. Añada reacciones adicionales para compensar el error de pipeteado. Aunque este enfoque consume una pequeña cantidad de cada reactivo, garantiza que haya disponible suficiente mezcla de amplificación de PCR para todas las muestras.
5. Ensamble la mezcla de amplificación de PCR como se describe en la tabla 3. Añada el volumen final de Water, Amplification Grade, OncoMate™ 5X Master Mix y OncoMate™ 5X Primer Mix a un tubo limpio de 1,5 ml. La plantilla de ADN se agregará a cada pocillo de reacción de manera individual en el paso 7.

Nota: En la tabla 3 se asume que la plantilla de ADN se administra a la reacción en el paso 7 con un volumen constante en todas las muestras.

Tabla 3. Ensamblaje de la mezcla de amplificación de PCR.

Componente de la mezcla de amplificación de PCR ¹	Volumen por reacción	×	Número de reacciones	=	Volumen final
Water, Amplification Grade	Hasta un volumen final de 10 µl	×		=	
OncoMate™ MSI 5X Master Mix ²	2 µl	×		=	
OncoMate™ MSI 5X Primer Mix	2 µl	×		=	
Plantilla de ADN (1,0 ng)	Hasta 6 µl				
Volumen total de reacción	10 µl				

¹ Combine Water, Amplification Grade, OncoMate™ 5X Master Mix y OncoMate™ 5X Primer Mix en un tubo nuevo de 1,5 ml. La plantilla de ADN se agregará a cada pocillo de reacción de manera individual en el paso 7.

² Puede formarse un precipitado en la OncoMate™ MSI 5X Master Mix. La presencia del precipitado no afectará a la amplificación del ADN realizada mediante el OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

6. Mezcle en vórtex la mezcla de amplificación de PCR tres veces durante 3 segundos cada una a máxima velocidad y, a continuación, pipetee la mezcla de amplificación de PCR necesaria para una reacción en cada pocillo de la o las placas de reacción utilizadas para las muestras y los controles.

Nota: Si no se mezcla en vórtex lo suficiente la mezcla de amplificación de PCR, puede tener lugar una amplificación deficiente o un desequilibrio entre marcadores. En cuanto la mezcla de amplificación de PCR esté preparada, añádala a los pocillos de la placa de reacción. Continúe rápidamente con los pasos del 7 al 10; justo después, proceda con el ciclo térmico.

7. Mezcle en vórtex cada plantilla de ADN FFPE diluida (preparadas en la sección 4.1) tres veces durante 5 segundos cada una a máxima velocidad y centrifugue brevemente (1-2 segundos) en una minicentrífuga para recoger el líquido en el fondo del tubo. Pipetee 1,0 ng de la muestra en el pocillo correspondiente de la placa que contiene la mezcla de amplificación de PCR. Mezcle mediante pipeteado varias veces.
8. Mezcle en vórtex el 2800M Control DNA diluido (preparado en la sección 4.2) tres veces durante 10 segundos cada una a máxima velocidad y centrifugue brevemente (1-2 segundos) en una minicentrífuga para recoger el líquido en el fondo del tubo. Pipetee 1,0 ng de la dilución del 2800M Control DNA en el o los pocillos reservados para las reacciones de control positivo. Mezcle mediante pipeteado varias veces.
9. En lo que respecta al control de amplificación negativo, pipetee un volumen de Water, Amplification Grade que sea equivalente al volumen de la plantilla de ADN en el o los pocillos reservados para las reacciones de control negativo. No añada la plantilla de ADN a las reacciones de control negativo. Mezcle mediante pipeteado varias veces.

Nota: Si no se amplifican y analizan las reacciones de control negativo y positivo, se puede provocar incertidumbre durante el análisis de los datos de los resultados y complicar la resolución de problemas. Las reacciones de control positivo y negativo deben incluirse en cada placa.

10. Tape los pocillos con las MicroAmp® 8-Cap Strips y centrifugue brevemente en una minicentrífuga de placas para llevar el contenido al fondo de los pocillos y eliminar las burbujas de aire.

4.4 Ciclo térmico

1. Asegúrese de que la tapa calefactada haya alcanzado la temperatura programada (103-105 °C) y coloque la placa de reacción en un termociclador. Cierre la tapa del termociclador.
2. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante para ejecutar el protocolo especificado en la figura 4. Cerciórese de que el volumen de la reacción esté ajustado en 10 µl. El tiempo total del ciclo, incluida la rampa, es de aproximadamente 1 hora y 15 minutos.

Protocolo de ciclo térmico¹

96 °C durante 1 minuto, después:

96 °C durante 10 segundos

58 °C durante 1 minuto

72 °C durante 30 segundos

durante 29 ciclos, después:

60 °C durante 10 minutos, después:

Mantener a 4 °C

¹ Volumen de reacción: 10 µl; tapa calefactada: de 103 a 105 °C

Figura 4. Protocolo de ciclo térmico del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

- Una vez completado el protocolo de ciclo térmico, proceda con el análisis de los fragmentos mediante electroforesis capilar, o bien guarde los productos de amplificación protegidos de la luz por la noche a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C o durante un periodo prolongado a entre -30 °C y -10 °C.



Nota: El almacenamiento a largo plazo de muestras amplificadas a temperaturas superiores a -10 °C puede producir artefactos que interfieran en el análisis de los datos.

4.5 Preparación del instrumento de electroforesis capilar



Consulte la sección 3.6 para conocer los requisitos del instrumento de electroforesis capilar. Siga las instrucciones del fabricante relativas al funcionamiento y mantenimiento del instrumento de electroforesis capilar elegido y al uso del polímero y los conjuntos de capilares asociados.

- Asegúrese de que el polímero y los tampones del instrumento no hayan caducado y de que haya suficientes muestras o inyecciones disponibles para completar el análisis planificado.
- Si procede, precaliente el horno de electroforesis capilar según las instrucciones del fabricante durante 30 minutos como mínimo antes de iniciar un análisis.

4.6 Preparación de los fragmentos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System para la electroforesis capilar

- Si las muestras amplificadas se almacenaron a entre -30 °C y -10 °C, descongélas por completo antes de continuar. Mezcle en vórtex durante 5 segundos y centrifugue la placa entre 5 y 10 segundos en una minicentrífuga de placas para recoger el contenido en el fondo de los pocillos.
- Determine el número de pocillos necesarios para analizar todas las muestras amplificadas, incluidas las reacciones de control positivo y negativo. Suma a este número los pocillos no utilizados en los que se iniciará una inyección más los pocillos adicionales para compensar el error de pipeteado.
- Mezcle en vórtex el Size Standard 500 tres veces durante 3 segundos cada una a máxima velocidad y prepare la mezcla de carga de electroforesis capilar como se indica en la tabla 4.



Nota: La formamida es un irritante y teratógeno; se debe evitar la inhalación y el contacto con la piel. Lea la etiqueta de advertencia y tome las precauciones pertinentes cuando manipule esta sustancia. Utilice siempre guantes y gafas de seguridad cuando trabaje con formamida.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de carga de electroforesis capilar.

Mezcla de carga	Volumen por pocillo	×	Número de pocillos	=	Volumen final
Hi-Di™ Formamide	9,5 µl	×		=	
Size Standard 500	0,5 µl	×		=	
Volumen total	10 µl				

- Mezcle en vórtex la mezcla de carga tres veces durante 3 segundos cada una a máxima velocidad y centrifugue brevemente (1-2 segundos) en una minicentrífuga para recoger los reactivos en el fondo del tubo.

5. Pipetee 10 µl de la mezcla de carga en los pocillos pertinentes de una MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate con el instrumento de electroforesis capilar seleccionado.

Nota: Se debe añadir la mezcla de carga o la Hi-Di™ Formamide a los pocillos en los que se inicie una inyección, con independencia de que también se agreguen o no productos amplificados. Si no se añade la mezcla de carga o la Hi-Di™ Formamide a un pocillo en el que se realice una inyección, se pueden producir daños en el conjunto de capilares y fallos en el análisis.

6. Añada 1 µl de muestra amplificada o reacción de control a los pocillos correspondientes.
7. Cubra los pocillos con septos según las instrucciones del fabricante del instrumento.
8. Centrifugue la placa entre 5 y 10 segundos para llevar la mezcla de formamida y muestra al fondo de cada pocillo y eliminar las burbujas de aire.
9. Desnaturalice las muestras a 95 °C durante 3 minutos en un termociclador y, a continuación, enfríe de inmediato la placa de reacción en hielo picado durante, como mínimo, 3 minutos. Desnaturalice las muestras justo antes de cargar la placa en el instrumento de electroforesis capilar.
Nota: No cierre la tapa calefactada del termociclador, ya que pueden fundirse los septos de la placa.
10. Cargue la placa en el instrumento de electroforesis capilar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si procede, asegúrese de que el horno haya alcanzado la temperatura requerida antes de la carga.

4.7 Detección de fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar con detección por fluorescencia

Consulte el manual técnico del instrumento de electroforesis capilar seleccionado para obtener información sobre cómo realizar un análisis de fragmentos, incluido cómo configurar la calibración espectral y los métodos de análisis de fragmentos, añadir información para las muestras, cargar muestras desnaturalizadas en el instrumento, iniciar un análisis y recuperar datos de un análisis completado. Al programar el instrumento, comience con el método de análisis de fragmentos predeterminado para la configuración específica. Puede que sea necesario optimizar el tiempo de inyección para satisfacer las necesidades concretas del laboratorio. El usuario es el responsable de asegurarse de que las condiciones seleccionadas para la electroforesis capilar sean compatibles con el análisis. Póngase en contacto con la oficina o el distribuidor local de Promega, o bien envíe un mensaje de correo electrónico a la dirección **genetic@promega.com** para obtener más información.

5. Análisis de los datos

5.1 Introducción

La electroforesis capilar de los productos de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System genera archivos de datos (.fsa) que requieren un análisis posterior mediante un software de análisis de fragmentos (figura 5). Los objetivos del análisis de datos son proporcionar información básica sobre la calidad de los datos, los picos de tamaño de los fragmentos en el rango de análisis definido, ayudar a filtrar los picos de artefactos de los picos de alelos presentes en cada marcador y resumir el tamaño de los alelos por marcador para interpretar los resultados más adelante. Realice los siguientes pasos para analizar los datos de la electroforesis capilar con el software de análisis de fragmentos:

Siga estos pasos una vez antes del primer análisis; consulte el apéndice C (sección 11.3) para obtener instrucciones:

- Defina los tamaños conocidos de los fragmentos del estándar de tamaño (es decir, cree o importe la opción Size Standard [Estándar de tamaño] del análisis).
- Asigne el rango de tamaño de análisis para cada marcador (es decir, cree o importe la opción Panels [Paneles] del análisis).
- Establezca los parámetros del análisis (es decir, cree o importe el Analysis Method [Método de análisis]).
- Opcional: gestione la visualización de los datos (es decir, cree o importe los ajustes Table Settings [Configuración de tablas], Plot Settings [Configuración de gráficos] y Report Settings [Configuración de informes]).

Siga estos pasos con cada lote de muestras analizadas; consulte la sección 5.2 para obtener instrucciones:

- Importe los archivos de datos.
- Seleccione las entradas de análisis (es decir, las opciones Size Standard [Estándar de tamaño], Panels [Paneles] y Analysis Method [Método de análisis] del análisis).
- Realice el análisis de datos.
- Resuma el tamaño de los alelos por marcador.

Se utilizó el GeneMapper® Software para evaluar el rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. En el apéndice C (sección 11.3) se proporcionan, a modo de referencia, los ajustes finales empleados durante la evaluación del rendimiento del análisis de datos. Estos ajustes se optimizaron para identificar el alelo distinto más pequeño (en bp) de cada marcador de repetición de mononucleótidos y para distinguirlo de los picos de artefactos de los fragmentos para su análisis posterior. En circunstancias específicas, los diferentes alelos que hay en una muestra pueden filtrarse al utilizar los ajustes de análisis recomendados. Estos alelos filtrados no se usan para determinar la estabilidad del marcador en cuestión (consulte la sección 6.4), ya que no son su alelo distinto más pequeño. El flujo de trabajo para analizar los datos de los fragmentos se ilustra en la figura 5 y se describe a continuación en la sección 5.2 (utilizando el GeneMapper® Software como ejemplo). Para obtener instrucciones adicionales sobre el análisis de datos de fragmentos con el GeneMapper® Software, consulte la *guía de usuario de análisis de fragmentos de ADN mediante electroforesis capilar* de Thermo Fisher Scientific.



Notas:

1. Los ajustes Analysis Method (Método de análisis) y Panels (Paneles) se determinaron en el OncoMate™ MSI Dx Analysis System usando datos generados con un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con el POP-7® Polymer y un conjunto de 50 cm. El análisis de los datos obtenidos mediante diferentes configuraciones del instrumento de electroforesis capilar puede requerir la modificación de los archivos del panel y del método de análisis. Si necesita ayuda, póngase en contacto con la oficina o el distribuidor local de Promega, o bien envíe un mensaje de correo electrónico a la dirección **genetic@promega.com**.
2. El ajuste Analysis Method (Método de análisis) que aparece en el apéndice C puede servir como modelo para desarrollar la configuración del análisis en su sistema de electroforesis capilar. Sin embargo, los umbrales analíticos (“Peak Amplitude Thresholds” [Umbrales de amplitud de picos] en la pestaña “Peak Detector” [Detector de picos] del “Analysis Method Editor” [Editor del método de análisis] de GeneMapper®) debe determinarlos el laboratorio en cuestión en función de los picos de intensidad de la muestra, el rango dinámico del instrumento y el ruido o la señal de fondo que se observen en los datos analizados (consulte la sección 7.5). Se empleó un umbral analítico de 175 RFU para cada canal de color (B, G, Y y O) durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Los umbrales analíticos para un instrumento adecuado de electroforesis capilar suelen encontrarse entre 50 RFU y 200 RFU. La correcta utilización y el efecto de las distintas configuraciones de análisis pueden consultarse en la *guía de usuario de análisis de fragmentos de ADN mediante electroforesis capilar* de Thermo Fisher Scientific.



Figura 5. Flujo de trabajo para analizar los datos de la electroforesis capilar del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

5.2 Análisis de datos

Para su comodidad, aquí se exponen las instrucciones sobre el análisis de datos con el GeneMapper® Software. En estas instrucciones, se da por sentado que ha importado los archivos de configuración disponibles de GeneMapper® descritos en el apéndice C (sección 11.3) o que ha creado unos archivos de configuración similares. Si utiliza otro software para el análisis de datos, consulte la guía de usuario correspondiente para obtener información e instrucciones.

1. Abra el GeneMapper® Software (versión 5.0 o 6.0).
2. Seleccione el icono “New Project” (Nuevo proyecto) () en la barra de herramientas y elija **Microsatellite** (Microsatélite) como tipo de proyecto.
3. Para importar los datos, seleccione el icono “Add Samples To Project” (Añadir muestras al proyecto) () en la barra de herramientas.
4. En el menú desplegable “Table Setting” (Configuración de tablas) de la barra de herramientas, seleccione **OncoMate_MSI_Dx_Table_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Tabla_v1.0).
5. Si el campo “Sample Type” (Tipo de muestra) no está rellenado, seleccione **Sample** (Muestra), **Positive Control** (Control positivo) o **Negative Control** (Control negativo) para describir cada muestra.
6. En todas las muestras de control y de los pacientes, seleccione **OncoMate_MSI_Dx_Analysis_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Análisis_v1.0) para “Analysis Method” (Método de análisis), **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Paneles_v1.0) para “Panel” y **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Tamaño_v1.0) para “Size Standard” (Estándar de tamaño).
7. Seleccione el icono “Analyze” (Analizar) () en la barra de herramientas para analizar todas las muestras. Cuando se le solicite, proporcione un nombre descriptivo para el proyecto en la ventana emergente “Save Project” (Guardar proyecto) y seleccione **OK** (Aceptar).

Nota: Después del análisis, las muestras pueden ordenarse mediante la opción **Sort...** (Ordenar...), en el menú **Edit** (Editar) (por ejemplo, por **Sample Type** [Tipo de muestra] y **Sample Name** [Nombre de muestra]). Reordenar las muestras de modo que cada par de muestras normal y tumoral queden adyacentes en la lista de muestras ayudará en su visualización y revisión al utilizar el archivo “Plot Settings” (Configuración de gráficos) proporcionado (consulte el paso 8). La ordenación también se puede usar para asegurarse de que los electroferogramas del par de muestras normal y tumoral se impriman en la misma página (consulte el paso 9c).

8. Revise la calidad de las muestras de control y de los pacientes como se indica en la sección 6.3. Seleccione las filas que contengan las muestras de control o de los pacientes y, a continuación, el icono “Display Plots” (Mostrar gráficos) () en la barra de herramientas para ver los electroferogramas y los datos tabulados de los alelos. En el menú desplegable “Plot Setting” (Configuración de gráficos) de la barra de herramientas, seleccione **OncoMate_MSI_Dx_Plot_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Gráfico_v1.0).

Nota: Se deben revisar los electroferogramas de las muestras para evaluar la calidad de los datos. Se recomienda revisar primero los controles y, después, las muestras de los pacientes. Las muestras de control seleccionadas junto con las muestras de los pacientes se visualizarán de forma continua en la ventana “Samples Plot” (Gráfico de muestras) y no se podrán minimizar, por lo que se abarrotará la pantalla.

9. Revise las muestras válidas de los pacientes para determinar el estado de MSI como se indica en las secciones 6.4 y 6.5. Visualice los datos de las muestras como se describe en el paso 8. Para facilitar la interpretación de la información, los datos de dimensionado pueden exportarse para su posterior análisis de varias maneras, incluidas las que se detallan aquí.

Nota: Estas opciones de exportación de datos se exponen con fines meramente informativos. Es responsabilidad del laboratorio que lleva a cabo la prueba precisar el formato de datos más adecuado para utilizarse en la determinación posterior del estado de MSI. Si necesita ayuda para desarrollar un método de generación de informes para su laboratorio, póngase en contacto con la oficina o el distribuidor local de Promega, o bien envíe un mensaje de correo electrónico a la dirección **genetic@promega.com**.

a. Un archivo de texto que incluye tamaños de alelos filtrados y otros datos de muestras se puede exportar como “Genotypes Table” (Tabla de genotipos) de la siguiente manera:

- i. En la pantalla principal, seleccione una o más muestras de control y de pacientes. A continuación, elija el icono “Display Plots” (Mostrar gráficos) () en la barra de herramientas para abrir la ventana “Samples Plot” (Gráfico de muestras).
- ii. Si la “Genotypes Table” (Tabla de genotipos) no aparece bajo los electroferogramas, seleccione el icono “Genotypes Table” (Tabla de genotipos) () en la barra de herramientas.
- iii. Seleccione **Export Table** (Exportar tabla) en el menú **File** (Archivo) y guarde el archivo para su posterior análisis.

b. Un archivo de texto que incluye tamaños de alelos filtrados y otros datos de muestras se puede exportar como “Report” (Informe) de la siguiente manera:

- i. En la pantalla principal, seleccione una o más muestras de control y de pacientes. A continuación, elija el icono “Report Manager” (Administrador de informes) () en la barra de herramientas para abrir la ventana “Report Manager” (Administrador de informes).
- ii. En el menú desplegable “Report Setting” (Configuración de informes) de la barra de herramientas, seleccione **OncoMate_MSI_Dx_Report_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Informe_v1.0).
- iii. Seleccione **Export...** (Exportar...) en el menú **File** (Archivo), asigne un nombre al archivo y seleccione **Export** (Exportar).

Nota: Hay disponibles diferentes campos de datos para la exportación como “Genotypes Table” (Tabla de genotipos) frente a “Report” (Informe). Se pueden añadir campos para satisfacer las necesidades específicas de su laboratorio. Para ello, basta con editar los archivos “Table Settings” (Configuración de tablas) o “Report Settings” (Configuración de informes) proporcionados de OncoMate™ en el administrador de GeneMapper®.

- c. Un resumen de datos en formato de documento portátil (.pdf) que muestra electroferogramas y tamaños de alelos tabulados se puede guardar de la siguiente manera:
- En la pantalla principal, seleccione una o más muestras de control y de pacientes. A continuación, elija el icono “Display Plots” (Mostrar gráficos) () para abrir la ventana “Samples Plot” (Gráfico de muestras).
 - Seleccione **Print...** (Imprimir...) en el menú **File** (Archivo). Elija **Microsoft Print to PDF** (Impresión de Microsoft a PDF) (o una opción equivalente) como “Print Service” (Servicio de impresión) y **Landscape** (Horizontal) como orientación. Seleccione **Print** (Imprimir) y póngale un nombre al archivo .pdf resultante.

Nota: Se pueden generar varios archivos .pdf durante este proceso, con lo que se requerirán distintos nombres. Por esta razón, los laboratorios pueden optar por guardar un documento .pdf independiente por cada par de muestras.

6. Revisión e interpretación de los resultados

En esta sección, se recogen las consideraciones que deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar la calidad de los datos e interpretar el estado de MSI de las muestras analizadas con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System. El software de análisis de fragmentos puede ofrecer diversas opciones para la visualización y revisión de los datos. Por ejemplo, el GeneMapper® Software brinda distintas opciones para mostrar y resumir los datos de las muestras. Para obtener más información sobre la revisión de los datos, consulte la *guía de usuario de análisis de fragmentos de ADN mediante electroforesis capilar* de Thermo Fisher Scientific.

6.1 Interpretación de los datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System

El análisis de los productos de PCR del OncoMate™ MSI Dx Analysis System genera datos sobre la longitud de los fragmentos de ADN en relación con cada una de las regiones microsatélites amplificadas. Para interpretar los datos de un par de muestras normal y tumoral emparejadas, se evalúan los cinco marcadores de repetición de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y dos marcadores de repetición de pentanucleótidos (Penta C y Penta D) amplificados por el OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Se analizan los marcadores de repetición de mononucleótidos para determinar el estado de MSI del paciente. La amplificación de los marcadores de repetición de mononucleótidos mediante PCR produce un pico del alelo principal y una distribución más o menos en forma de campana de los picos de artefactos adyacentes, cada uno separado por 1 bp (Bacher, 2004). Dentro de cualquier distribución individual de los picos de artefactos, el pico con el mayor valor de fluorescencia (RFU) es el pico del alelo (figura 6). Puede haber más de un alelo y una distribución de picos de artefactos por marcador en las muestras tanto de tejido normal (cuando son heterocigóticas) como de tejido tumoral (cuando son heterocigóticas o inestables). El software de análisis de fragmentos, como el GeneMapper® Software, utiliza algoritmos de filtrado de picos para aislar los alelos presentes en cada marcador de los picos de artefactos. El tamaño de estos alelos se muestra en un electroferograma y se tabula para su posterior interpretación con respecto a la MSI.

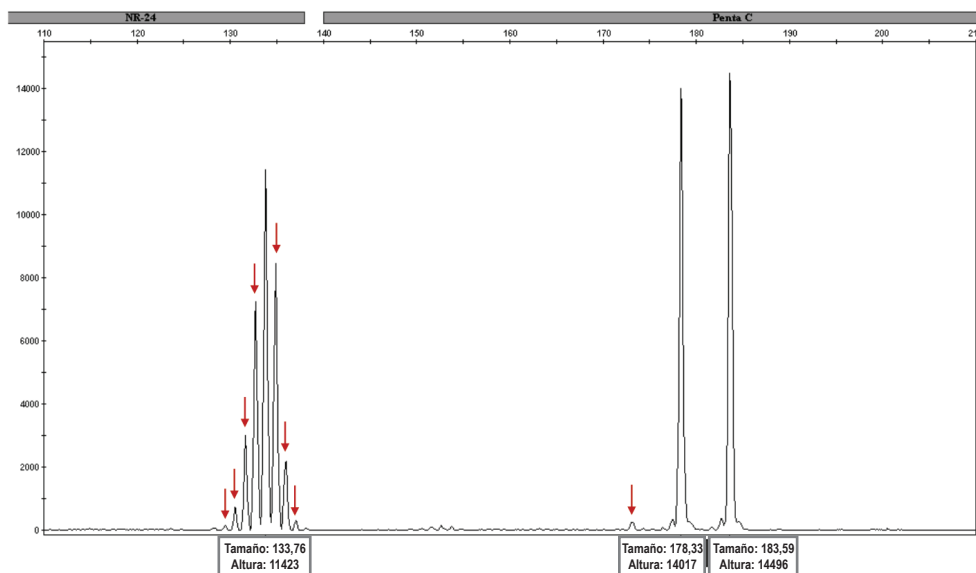


Figura 6. Los picos de artefactos (indicados por las flechas) generados por el deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación mediante PCR de repeticiones cortas en tándem pueden verse con total claridad en los marcadores mononucleótidos a intervalos de 1 bp a partir del pico original o el más alto del alelo, representado aquí a través del marcador NR-24 (izquierda).

También pueden observarse picos de artefactos mucho más pequeños en los marcadores pentanucleótidos de 5 bp a partir de los picos originales de los alelos, representados aquí a través del marcador Penta C.

Cuando un marcador de una muestra tumoral es inestable, se detectan uno o más alelos nuevos que son diferentes de los alelos normales (figura 7). Para detectar una diferencia en el tamaño de los alelos, se comparan los datos de la muestra tumoral con los de la muestra normal emparejada. Las muestras tumorales se clasifican como MSI-H cuando $\geq 40\%$ de los marcadores de repetición de mononucleótidos muestran nuevos alelos (es decir, cuando ≥ 2 de 5 marcadores presentan perfiles alélicos alterados). Las muestras tumorales con menos de dos marcadores de repetición de mononucleótidos alterados pueden clasificarse como MSS (Umar, 2004; Boland, 1998).

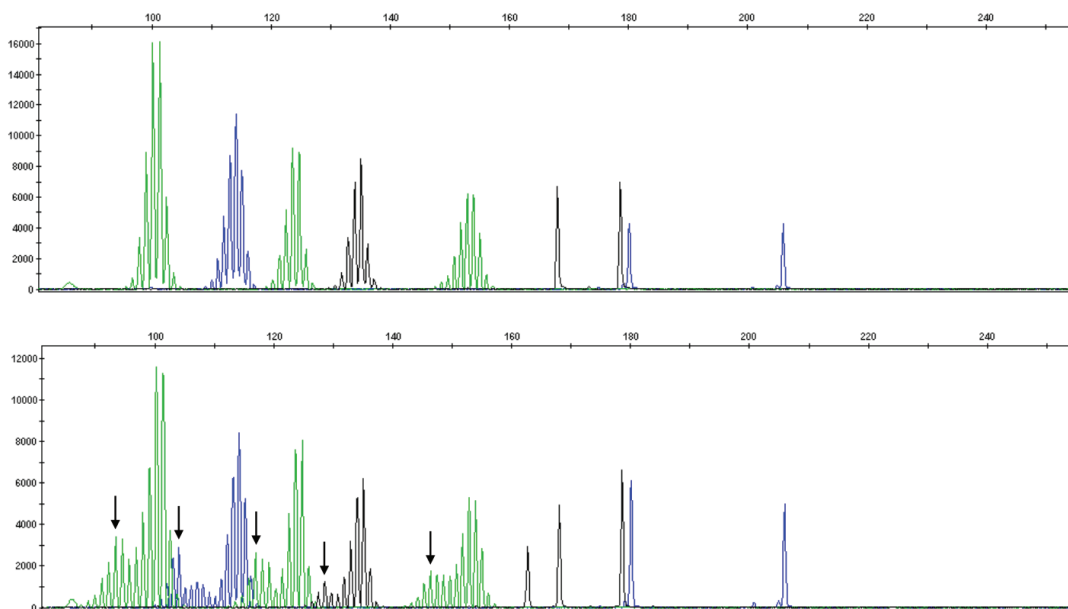


Figura 7. Se analizaron muestras de pacientes normales (panel superior) y tumorales (panel inferior) emparejadas utilizando el OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Se amplificó y analizó un nanograma de ADN mediante un Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con el POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm. La presencia de nuevos alelos en la muestra tumoral (marcados con las flechas) que no aparecían en la muestra normal de referencia indica inestabilidad del marcador. La muestra presentada es MSI-H, ya que ≥ 2 marcadores de repetición de mononucleótidos señalan inestabilidad.

6.2 Resumen de anomalías de electroforesis capilar y artefactos de amplificación conocidos

Cuando se emplea un POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm para la electroforesis capilar, se observa un artefacto de amplificación conocido dentro del marcador NR-21 como un único pico amplio en el rango de tamaño de 83 bp a aproximadamente 90 bp (figura 8). Este pico no debe considerarse como un alelo a la hora de determinar la estabilidad del marcador NR-21. La presencia de picos de n-1 bp de baja intensidad es común en los marcadores de repetición de pentanucleótidos, Penta D y Penta C.

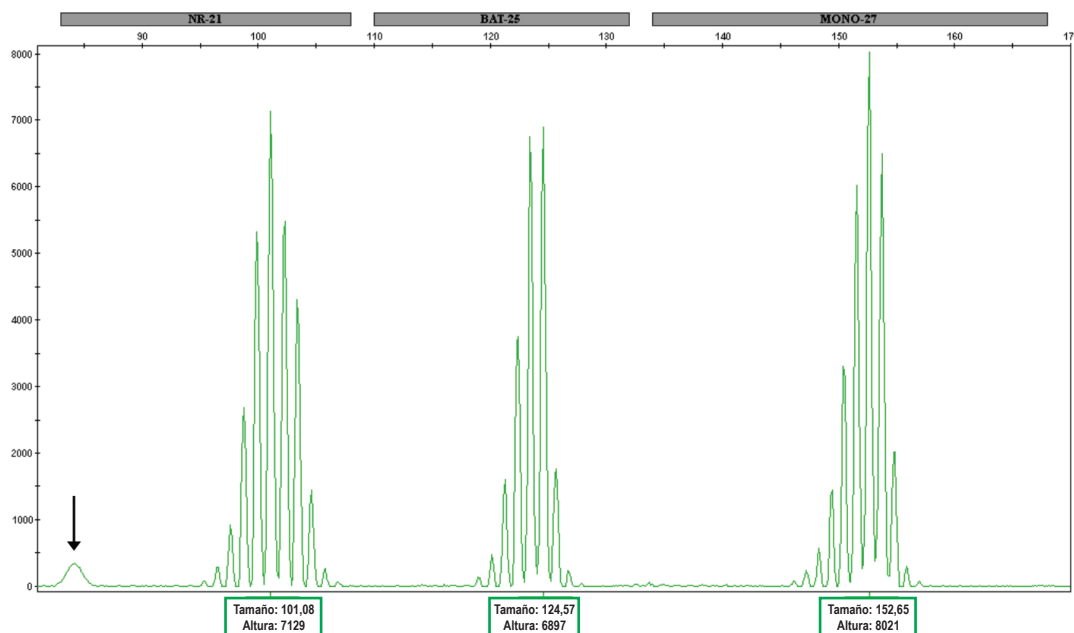


Figura 8. Se puede observar un artefacto de amplificación (indicado con una flecha) dentro del marcador NR-21 como un único pico amplio en el rango de tamaño de 83 bp a aproximadamente 90 bp. Este pico no debe considerarse como un alelo a la hora de determinar la estabilidad del marcador NR-21.

Pueden producirse otros artefactos de amplificación cuando se usa demasiado ADN como entrada en el OncoMate™ MSI Dx Analysis System. La señal basal del marcador BAT-26 (canal azul) puede elevarse y volverse irregular. A excepción de las entradas de extremos (por ejemplo, ≥ 4 ng de 2800M Control DNA), la adopción de los parámetros sugeridos de filtrado de picos en el análisis de GeneMapper® (consulte el apéndice C) filtrará estos artefactos cuando se identifiquen (es decir, se llamen) alelos del marcador BAT-26.

Durante la electroforesis capilar, también pueden observarse otras anomalías conocidas, pero aleatorias. Hay tres anomalías poco frecuentes que predominan: inyecciones fallidas, picos amplios y picos de señal.

- a. Cuando una inyección no se realiza correctamente, se inyecta poco ADN de muestra (o nada) en el conjunto de capilares. En estos casos, se observará un error de QC de la opción Sizing Quality (Calidad del dimensionado) (consulte la tabla 5) debido a la falta de picos de Size Standard 500 (o a su baja calidad). Sizing Quality (Calidad del dimensionado) es una característica del GeneMapper® Software por la que se calcula una puntuación basada en la forma de los picos, la coincidencia de tamaños y la curva de llamadas de tamaños. El ajuste se encuentra en el método de análisis.
- b. Se puede detectar un pico durante una electroforesis capilar que muestre una morfología amplia (es decir, no puntiaguda). Los picos amplios pueden originarse a partir de cristales u otros materiales anómalos que migren a través del conjunto de capilares.
- c. Durante la electroforesis capilar, se puede apreciar un pico de señal en forma de pico de anchura casi inexistente que abarca todos los canales de color. Al identificar los alelos, la mayoría de los programas de software de análisis de fragmentos detectan e ignoran estos picos.

6.3 Requisitos de control de calidad para la interpretación de los datos

Resulta fundamental conocer la calidad de los datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System para interpretar correctamente el estado de MSI del paciente. Debe existir un conjunto de controles de análisis (controles positivos y negativos) a fin de garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos y utilizados para la interpretación de la MSI (sección 7). Antes de determinar el estado de MSI de una muestra, se realizan una serie de comprobaciones de QC para garantizar la fiabilidad de la calidad de los datos (tabla 5). La mayoría de las comprobaciones de QC descritas a continuación requieren una inspección visual de los electroferogramas de las muestras; la evaluación de únicamente la tabla de alelos de un lote de muestras determinado no basta para verificar la calidad de los datos.

En la tabla 5, se presentan los tipos de muestras evaluados con cada comprobación de QC y el impacto de que dichas comprobaciones no se superen. Tras una evaluación de QC de los datos, las muestras de cada paciente tendrán el estado “Invalid” (No válida), que significa que no se puede interpretar la MSI debido a un error crítico en el QC de los datos, o “Valid” (Válida), que significa que no se ha observado ningún error crítico de QC o que, a pesar de él, se puede seguir interpretando el estado de MSI del paciente según las directrices proporcionadas en la sección 6.5.3. Cuando una muestra de control no supera ciertas comprobaciones de QC de los datos, la calidad de todas las muestras asociadas de los pacientes puede verse comprometida; además, se aplica el resultado “Invalid” (No válida) a todas las muestras del lote. Si los controles positivos y negativos han superado todas las pruebas de QC, las muestras de los pacientes (una por una) pueden superar o no las pruebas de QC de los datos. El estado de las muestras de los pacientes asociado a un error de QC se basa en si el fallo se observa en un control de amplificación positivo o negativo, o en la muestra en cuestión. Las muestras que no cumplan los requisitos de QC pueden tratarse de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección Solución de problemas de este manual técnico. Esta es una recomendación de progreso de la comprobación de la calidad de los datos:

1. Evaluar la calidad del dimensionado de todas las muestras de control y de pacientes
2. Evaluar los controles de lotes (es decir, los controles de amplificación positivos y negativos)
3. Evaluar las muestras de los pacientes

Tabla 5. Pruebas de QC de datos que deben realizarse antes de la interpretación de la MSI para conocer la calidad de los datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

				Estado de las muestras de los pacientes cuando una muestra de control o de paciente no supera la prueba de QC correspondiente	
Sección	Prueba de QC	Descripción de la prueba de QC	Muestras evaluadas¹	La muestra de control no supera el QC²	La muestra de paciente no supera el QC³
6.3.1	QC de calidad del dimensionado	Se calcula una puntuación de calidad basada en la forma de los picos, la coincidencia de tamaños y la curva de llamadas de tamaños.	+, -, N, T	Ninguna muestra válida	Muestra no válida
6.3.2	QC de control negativo	En el caso del control de amplificación negativo, no debe detectarse ningún pico por encima del umbral analítico.	—	Ninguna muestra válida	Muestras de paciente no evaluadas
6.3.3	QC de identidad de control positivo	En el control de amplificación positivo, los alelos presentes en los marcadores pentanucleótidos deben coincidir con los alelos esperados para el 2800M Control DNA en 1,5 pares de bases.	+	Ninguna muestra válida	Muestras de paciente no evaluadas
6.3.4	QC de picos fuera de escala	La intensidad (RFU) de los picos en una muestra determinada no debe superar el rango máximo detectable del instrumento de electroforesis capilar.	+, N, T	Ninguna muestra válida	Muestra no válida
6.3.5	QC de exceso de traspaso	Se evalúan los picos que están alineados por longitud en canales de colorante independientes para conocer el exceso de traspaso (es decir, el exceso de traspaso de señal entre los canales de colorante).	+, N, T	Ninguna muestra válida	Muestra no válida
6.3.6	QC de picos amplios	La anchura de los picos no debe superar el valor asignado para el análisis de MSI.	+, N, T	Véase la nota 4	Véase la nota 4
6.3.7	QC de amplificación de alelos	En cada marcador debe haber al menos un alelo por encima del umbral analítico.	+, N, T	Ninguna muestra válida	Marcador no válido; la muestra se puede interpretar

6.3.8	QC de contaminación de ADN	Por cada marcador pentanucleótido, no puede haber más de dos alelos en la muestra normal.	+, N	Ninguna muestra válida	Muestra no válida
6.3.9	QC de identidad de muestra de paciente	Por cada marcador pentanucleótido, los alelos identificados en la muestra normal deben estar presentes en la muestra tumoral (en 1,5 pares de bases).	T	Controles no evaluados	Véase la nota 5
6.3.10	QC de señal tumoral	Con respecto a los marcadores mononucleótidos que se han interpretado como estables, la altura de los picos de los alelos en la muestra tumoral debe ser suficiente para asegurar la sensibilidad del análisis. Los picos de intensidad requeridos se basan en el umbral analítico y el contenido tumoral de la muestra.	T	Controles no evaluados	Marcador no válido; la muestra se puede interpretar

¹ N: muestra normal; T: muestra tumoral; +: control positivo; -: control negativo.

² Resultado interpretativo de la MSI para todas las muestras de pacientes del lote cuando una muestra de control indica el problema de QC asociado.

³ La columna señala si las muestras de pacientes no son válidas o pueden aún interpretarse cuando se ven afectadas por el problema de QC asociado, a pesar del fallo de un marcador concreto. La indicación proporcionada requiere que las muestras de control hayan superado todas las pruebas de QC. Consulte las directrices de interpretación en la sección 6.5.

⁴ Se reconoce que el artefacto de pico amplio conocido entre 83 bp y 90 bp del marcador NR-21 durante la evaluación de QC de los datos no está relacionado con la inestabilidad. Todas las muestras deben interpretarse como no válidas si una muestra de control presenta un pico amplio distinto al artefacto conocido del marcador NR-21. Asimismo, los marcadores afectados deben interpretarse como no válidos si en una muestra de paciente se observa un pico amplio distinto al artefacto conocido del marcador NR-21.

⁵ Cuando el QC de identidad de la muestra del paciente no se supera debido a la ausencia de un alelo, la muestra puede interpretarse según las directrices proporcionadas en la sección 6.5.3. De lo contrario, la muestra no es válida.

6.3.1 Evaluación de todas las muestras para determinar la calidad del dimensionado (QC de calidad del dimensionado)

Los instrumentos de electroforesis capilar pueden proporcionar métricas sobre la calidad del dimensionado y estas también pueden mostrarse en el software de análisis de fragmentos. Los problemas de calidad del dimensionado suelen asociarse a un fallo del análisis mediante electroforesis capilar y tienen lugar en un solo capilar (es decir, no en todos los capilares de una inyección). En las muestras que presentan problemas de calidad del dimensionado, aparecen pocos picos de fragmentos (o ninguno) o picos de fragmentos que se amplían (es decir, pierden resolución) con el aumento de tamaño (figura 9). Evalúe la calidad del dimensionado de las muestras y los controles analizados, ya que se trata de información crucial para el resultado de la prueba.

Para evaluar la calidad del dimensionado, asegúrese de que el canal de colorante del Size Standard 500 (naranja) aparezca en el software de análisis de fragmentos y muestre los perfiles de pico esperados para los fragmentos del estándar de tamaño de 60 bp a 300 bp. Si se identifica cualquiera de los siguientes atributos, que indican una calidad deficiente del dimensionado, el resultado de la muestra de paciente o de control no es válido:

- El software de análisis de fragmentos o de recopilación de datos de la electroforesis capilar devuelve un indicador de calidad del dimensionado.

Nota: Para dimensionar los marcadores de MSI, solo se utilizan los fragmentos del Size Standard 500 de 60 bp a 300 bp. Los problemas de calidad aparentes de los picos del Size Standard 500 superiores a 300 bp no afectan al dimensionado de los fragmentos.

- Uno o más de los 13 fragmentos del Size Standard 500 de 60 bp a 300 bp no están marcados o lo están incorrectamente (60 bp, 65 bp, 80 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp y 300 bp). Esto puede ocurrir debido a una fuerte pendiente de pico a pico o a una ampliación de los picos en el estándar de tamaño. De manera ocasional, se pueden detectar picos anómalos durante la electroforesis capilar que podrían llevar a una identificación errónea de los picos del estándar de tamaño.

Nota: Puede haber picos de electroforesis capilar (es decir, picos sin anchura), pero no interferirán en el dimensionado de los fragmentos a menos que el software de análisis de fragmentos los marque incorrectamente como picos de estándar de tamaño.

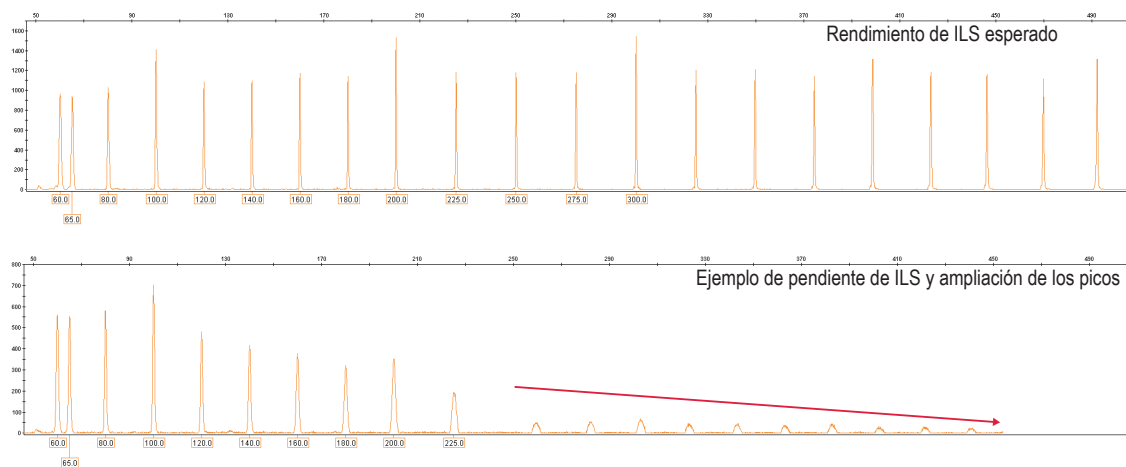


Figura 9. En el panel superior, aparece el resultado esperado del Size Standard 500. En el panel inferior, se observan una pendiente extrema y una ampliación de los picos, lo que indica un problema de calidad del dimensionado.

6.3.2 Evaluación de la reacción de control negativo para la amplificación (QC de control negativo)

Se debe analizar un control de amplificación negativo junto con las muestras de los pacientes. La detección de picos de fragmentos por encima del umbral analítico en los canales de colorante de las muestras (azul, verde y amarillo/negro) para el control de amplificación negativo indica que puede haberse dado contaminación. Un control negativo contaminado sugeriría posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras. Por lo tanto, ninguna muestra de paciente de un lote con una muestra de control negativo fallida debería considerarse válida.

6.3.3 Evaluación de los marcadores de repetición de pentanucleótidos para la reacción de control positivo en relación con la identidad (QC de identidad de control positivo)

Debe analizarse una muestra de control de amplificación positivo, preparada con el 2800M Control DNA, junto con las muestras de los pacientes para proporcionar pruebas de la integridad del análisis (es decir, que se observaron los resultados esperados). El QC de identidad de control positivo se evalúa mediante los marcadores Penta D y Penta C. La muestra de control de amplificación positivo presenta dos alelos en cada marcador de repetición de pentanucleótidos, que se detectan en los siguientes rangos de tamaño (bp) según nuestros datos de evaluación del rendimiento (las condiciones figuran en los apéndices B y C):

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

El hecho de que el control positivo no cumpla estos criterios indica posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras. Por lo tanto, ninguna muestra de paciente analizada de un lote con una muestra de control positivo fallida debería considerarse válida.

6.3.4 Evaluación de los picos de intensidad de los resultados fuera de escala (QC de picos fuera de escala)

Los instrumentos de electroforesis capilar tienen un alcance limitado para detectar señales fluorescentes en los fragmentos de ADN marcados con colorante. En algunas situaciones, la señal fluorescente de los productos de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System puede superar el límite superior del detector. Cuando esto ocurre, el instrumento devuelve un indicador de QC de picos fuera de escala, que también se muestra en el software de análisis de fragmentos. Los picos de intensidad fuera de escala pueden dar lugar a un exceso de traspaso de señal en otros canales de colorante (figura 10; sección 6.3.5). Dado que los patrones de exceso de traspaso de los picos se parecerán al patrón de señal original, dicho exceso puede confundirse con un alelo en una muestra normal o tumoral, lo que complica la interpretación de la MSI. Una muestra de paciente o de control debería considerarse no válida cuando se observan resultados fuera de escala. Los resultados fuera de escala observados en los controles de amplificación positivos del 2800M indican un problema sistémico al preparar o amplificar las reacciones del OncoMate™ MSI Dx Analysis System y posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras analizado. En los lotes en los que un control positivo no supera el QC de picos fuera de escala, todas las muestras del lote deben interpretarse como no válidas y tratarse de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección 9. Evalúe los datos de los resultados fuera de escala en cada muestra analizada y el control de amplificación del 2800M.

6.3.5 Evaluación de todos los marcadores para determinar el exceso de traspaso (QC de exceso de traspaso)

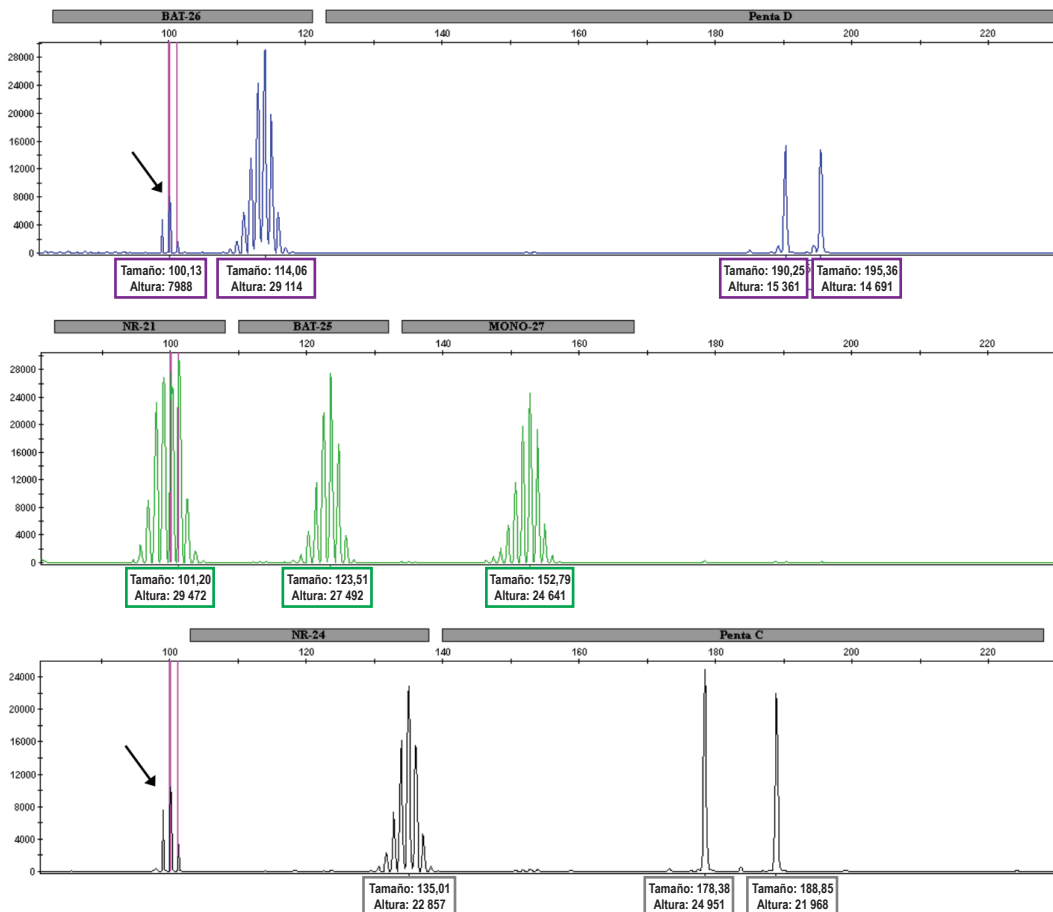
Cuando se observan resultados fuera de escala o la calibración espectral del instrumento de electroforesis capilar es inadecuada (por ejemplo, debido a ajustes en la óptica del instrumento durante una llamada de asistencia), se pueden detectar señales fluorescentes de los fragmentos marcados con colorante fuera del canal de color previsto con aproximadamente el mismo tamaño (bp) que la señal real. Esta situación se conoce como “exceso de traspaso”. Cuando se detecta exceso de traspaso en otros canales de colorante, el software de análisis de fragmentos puede mostrar un indicador de QC.

Consulte el manual técnico del software de análisis de fragmentos seleccionado para ajustar los parámetros de detección del exceso de traspaso. En el apéndice C se proporcionan los parámetros que coinciden con los utilizados durante la evaluación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Dado que los patrones de los picos se parecerán al patrón de señal original, este exceso de traspaso puede confundirse con un alelo en una muestra normal o tumoral, lo que complica la interpretación de la MSI. Las señales de exceso de traspaso presentes en los controles de amplificación positivos del 2800M indicarán posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras del análisis. Por estos motivos, las muestras de pacientes o de control afectadas deberían considerarse como no válidas si se observa exceso de traspaso por encima del umbral analítico. Evalúe los datos del exceso de traspaso en cada muestra de paciente analizada y en el control de amplificación positivo. Para estudiar las muestras en busca de picos de exceso de traspaso, muestre todos los canales de colorante visualizados en el mismo gráfico (figura 10). Busque picos del mismo tamaño que aparezcan en dos o más canales de colorante. Los picos originales de un canal de colorante serán de una intensidad significativamente mayor que los picos de exceso de traspaso de los demás canales de colorante. En cuanto a los fragmentos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System, se puede observar exceso de traspaso en los siguientes patrones:

- a. Se pueden observar picos de BAT-26 en los paneles NR-21 o BAT-25.
- b. Se pueden observar picos de Penta D en los paneles BAT-25 o MONO-27.
- c. Se pueden observar picos de NR-21 en los paneles BAT-26 o NR-24.
- d. Se pueden observar picos de BAT-25 en los paneles BAT-26, Penta D o NR-24.
- e. Se pueden observar picos de MONO-27 en los paneles Penta D, NR-24 o Penta C.
- f. Se pueden observar picos de NR-24 en los paneles NR-21, BAT-25 o MONO-27.
- g. Se pueden observar picos de Penta C en el panel MONO-27.

En algunas situaciones, los picos originales de los fragmentos pueden alinearse en los canales de colorante y confundirse con el exceso de traspaso. En estas ocasiones, repita la calibración espectral del instrumento de electroforesis capilar y vuelva a realizar el análisis para garantizar la fiabilidad de los datos y la interpretación de MSI resultante.



16186TA

Figura 10. Muestra de tejido normal fuera de escala, con un notable exceso de traspaso de señal entre los canales de colorante. Los picos del marcador NR-21 superaron el límite de detección del instrumento de electroforesis capilar, lo que originó un indicador de fuera de escala y un pico de exceso de traspaso de un patrón similar en otros marcadores. **Panel A.** Marcadores del canal de colorante azul; destaca un grupo de picos de exceso de traspaso de señal del marcador NR-21 al BAT-26. **Panel B.** Marcadores del canal de colorante verde; destacan los picos fuera de escala de los fragmentos del NR-21. **Panel C.** Marcadores del canal de colorante amarillo/negro; los picos de exceso de traspaso del NR-21 en este canal de colorante quedan fuera de los paneles de marcadores.

6.3.6 Evaluación de todos los marcadores para determinar los picos amplios (QC de picos amplios)

Pueden observarse picos amplios de fragmentos y llamarse como alelos en los datos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System. Estos picos presentan un suave patrón de ascenso y descenso que abarca varios pares de bases y se distinguen con facilidad de los picos originales de los fragmentos, que ascienden y descienden bruscamente en un tramo de 1 bp a 2 bp. Los picos amplios pueden observarse esporádicamente como resultado de una amplificación mediante PCR anómala o un análisis por electroforesis capilar. A menudo se aprecia un artefacto conocido de amplificación de picos amplios entre 83 bp y 90 bp en el marcador NR-21 del OncoMate™ MSI Dx Analysis System (consulte la sección 6.2 para obtener más detalles). Cuando se ven picos amplios, el software de análisis de fragmentos puede mostrar un indicador de QC.

Consulte el manual técnico del software de análisis de fragmentos seleccionado para ajustar los parámetros de detección de picos amplios. En el apéndice C (sección 11.3) se proporcionan los parámetros que coinciden con los utilizados durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Inspeccione las muestras de pacientes y de control en cada marcador para detectar picos amplios que se hayan llamado como alelos. Un pico amplio en el marcador NR-21 entre 83 bp y 90 bp no está relacionado con la inestabilidad de microsatélites y su detección no indica un fallo en el QC de picos amplios. Cuando se detecta un pico amplio en uno o más marcadores, disminuye la calidad de los datos. En lo que respecta a los marcadores no afectados, se pueden seguir interpretando los datos según las directrices proporcionadas en la sección 6.5. Los picos amplios de las muestras de control pueden indicar posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras. En los lotes en los que una muestra de control no supera el QC de picos amplios, todas las muestras del lote deben interpretarse como no válidas y tratarse de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección 9.

6.3.7 Evaluación de todos los marcadores para determinar la amplificación de alelos (QC de amplificación de alelos)

Inspeccione las muestras de pacientes y los controles positivos del 2800M en cada marcador para evaluar si existe un pico original de fragmento por encima del umbral analítico (consulte las secciones 3.9 y 7.5). Cuando no se detecta ningún alelo en uno o más marcadores, disminuye la calidad de los datos de las muestras. Documente los marcadores en los que no se supere el QC de amplificación de alelos. En lo que respecta a los marcadores no afectados, se pueden seguir interpretando los datos según las directrices proporcionadas en la sección 6.3. **Nota:** Se debe detectar al menos un alelo tanto en la muestra de tejido normal como en la de tejido tumoral para que se pueda interpretar un marcador de repetición de mononucleótidos determinado. La ausencia de alelos en el control de amplificación positivo del 2800M indica posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras. En los lotes en los que una muestra de control positivo no supera el QC de amplificación de alelos, todas las muestras del lote deben interpretarse como no válidas y tratarse de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección 9.

6.3.8 Evaluación de las muestras de pacientes normales y de control de amplificación positivo para determinar la contaminación del ADN (QC de contaminación de ADN)

En ocasiones, el análisis del número de alelos detectados en los marcadores de repetición de pentanucleótidos puede brindar información sobre la contaminación de las muestras provocada por fuentes externas de ADN humano. Cuento la cantidad de alelos identificados en cada marcador de repetición de pentanucleótidos de las muestras de pacientes normales y de control de amplificación positivo. El QC de contaminación de ADN no se supera cuando se detectan tres o más alelos en los marcadores Penta C o Penta D. La inestabilidad genómica asociada a ciertos tumores puede traducirse en la presencia de más de dos alelos en la muestra tumoral. Por lo tanto, la evaluación de las muestras tumorales de los pacientes mediante el QC de contaminación de ADN no ofrece información. El fallo observado en la muestra de control de amplificación positivo del 2800M indicaría posibles problemas de calidad de los datos con respecto a todo el lote de muestras. En los lotes en los que una muestra de control positivo no supera el QC de contaminación de ADN, todas las muestras del lote deben interpretarse como no válidas y tratarse de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección 9. Las muestras de pacientes normales que no superan el QC de contaminación de ADN deben considerarse no válidas y tratarse según las directrices proporcionadas en la sección 9.

6.3.9 Evaluación de los marcadores de repetición de pentanucleótidos de las muestras de pacientes para determinar la identidad (QC de identidad de muestra de paciente)

Compare los alelos de cada marcador de repetición de pentanucleótidos para confirmar que las muestras normales y tumorales se obtuvieron del mismo paciente. El QC de identidad de muestra de paciente se supera cuando todos los alelos identificados en la muestra normal también están presentes en la muestra tumoral. La inestabilidad genómica asociada a ciertos tumores puede traducirse en la presencia de más o menos alelos en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal. Si se observa la aparición de más alelos en la muestra tumoral, no se produce un fallo en el QC de identidad de muestra de paciente. Los alelos adicionales de la muestra tumoral en los marcadores Penta no implican MSI. Por otro lado, si falta un alelo en la muestra tumoral, puede indicar una alternación de las muestras o pérdida de heterocigosidad (LOH) en el marcador (consulte la sección 6.5.3). Los pares de muestras que no superen el QC de identidad de muestra de paciente debido a la ausencia de un alelo en la muestra tumoral podrán seguir interpretándose según las directrices proporcionadas en la sección 6.5.3. Los pares de muestras que no lo superen por otros motivos se considerarán no válidos y se tratarán de acuerdo con las instrucciones facilitadas en la sección 9. Los controles positivos y negativos no se someten al QC de identidad de muestra de paciente.

6.3.10 Evaluación de los marcadores de repetición de mononucleótidos de las muestras tumorales para determinar la señal (QC de señal tumoral)

En el caso de los marcadores de repetición de mononucleótidos, cuando no se identifican nuevos alelos en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal, el marcador se interpreta como estable. Sin embargo, el alelo normal (de referencia) de la muestra tumoral debe aparecer con una intensidad suficiente, según el contenido tumoral de la muestra, para garantizar que se detecten los alelos nuevos por encima del umbral analítico. Por consiguiente, debe inspeccionarse la intensidad de los picos en cada marcador de repetición de mononucleótidos aparentemente estable para determinar si la intensidad del alelo basta para asegurar la sensibilidad de detección de nuevos alelos del análisis.

Para la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System, se determinó que el umbral analítico era de 175 RFU con un contenido tumoral mínimo del 20 %, lo que correspondía a una fracción tumoral de 0,2. Con el fin de garantizar la sensibilidad del análisis, se empleó la siguiente fórmula para calcular un pico de intensidad mínimo necesario del alelo normal de 700 RFU en los marcadores de repetición de mononucleótidos aparentemente estables de las muestras tumorales:

$$\text{Intensidad de señal tumoral (RFU)} \geq \text{umbral analítico} \times \frac{1}{\text{fracción tumoral mínima}} \times (1 - \text{fracción tumoral mínima})$$

Con un pico de intensidad mínimo de 700 RFU y un contenido tumoral del 20 % (una fracción tumoral de 0,2), un nuevo alelo que represente inestabilidad tendría una altura de pico prevista de 175 RFU (es decir, 175 RFU es el 20 % de la señal total de 875 RFU, mientras que 700 RFU es el 80 % de la señal total de 875 RFU). De esta manera, se asegura que la intensidad de la señal sea suficiente para confiar en una llamada estable de un marcador determinado en muestras con ≥ 20 % de contenido tumoral. Documente los marcadores que no superen el QC de señal tumoral. En lo que respecta a los marcadores no afectados, se pueden seguir interpretando los datos según las directrices proporcionadas en la sección 6.5. Los controles positivos y negativos no se someten al QC de señal tumoral.

6.4 Determinación de la estabilidad de los marcadores de repetición de mononucleótidos

El análisis de los marcadores de repetición de mononucleótidos en las muestras normales y tumorales emparejadas determina la estabilidad de los marcadores, que informa del estado de MSI del tumor. La estabilidad se evalúa marcador por marcador y la inestabilidad se identifica mediante la presencia de uno o más nuevos alelos microsatélites en la muestra tumoral en comparación con la muestra normal del mismo paciente. En algunos tumores, pueden darse sutiles alteraciones de los alelos y es posible que el software de análisis de fragmentos existente no identifique los nuevos alelos diferentes; en tales muestras, se puede determinar inestabilidad a través de la comparación visual de electroferogramas en busca de diferencias. En otros tumores, como los de los pacientes con CRC MSI-H, las alteraciones en los perfiles de microsatélites son pronunciadas y hay nuevos alelos distintos con picos de artefactos adyacentes de intensidad decreciente. El análisis repetido de una muestra con mayor contenido tumoral o con diversos tiempos de inyección de electroforesis capilar puede tener un carácter informativo cuando la estabilidad de los marcadores es equívoca o indeterminada (Guedes, 2017; Wang, 2017; Boyle, 2014). El proceso de determinación de dicha estabilidad se resume en la figura 11. En la tabla 6 también se recogen los resultados que se pueden obtener al determinar la estabilidad de los marcadores de repetición de mononucleótidos. No se puede analizar la estabilidad de los marcadores en las muestras de pacientes identificadas como no válidas debido a un fallo crítico en el QC de los datos (sección 6.3).

Durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System, se empleó un sencillo algoritmo para determinar la estabilidad de los marcadores: en cada uno de los cinco marcadores de repetición de mononucleótidos de la muestra normal y la tumoral del paciente, el alelo más pequeño identificado se consideró el alelo de interés para las comparaciones posteriores. Se calculó la diferencia de tamaño entre los alelos de interés de las muestras normales y tumorales para determinar la estabilidad de los marcadores. Cuando esta diferencia era ≥ 3 bp (implementada en la práctica como $\geq 2,75$ bp para tener en cuenta la precisión de dimensionado del instrumento de electroforesis capilar), el marcador se interpretaba como inestable.

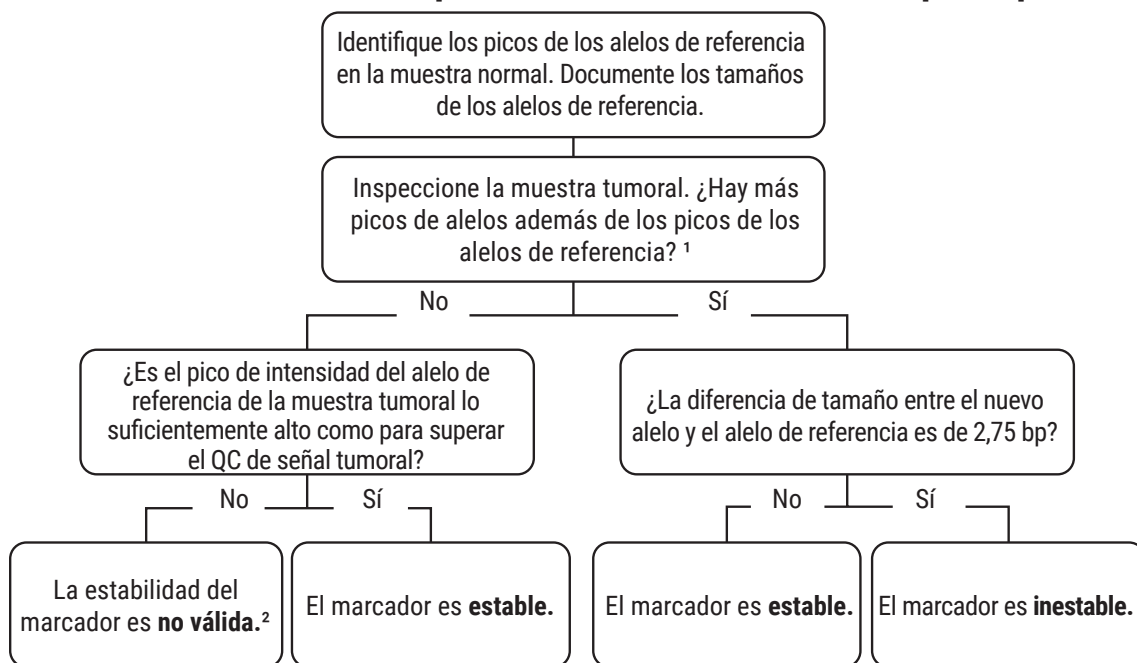
Tabla 6. Llamadas de estabilidad de los marcadores de repetición de mononucleótidos inferidas mediante la comparación de los alelos presentes en las muestras normales y tumorales.

Llamada de estabilidad de marcadores

La llamada de estabilidad asignada a cada marcador de la muestra

Valor	Descripción
Estable	No se detectó inestabilidad de microsatélites en el marcador de repetición de mononucleótidos. No se identificaron nuevos alelos en la muestra tumoral o la diferencia de tamaño entre un nuevo alelo tumoral y el alelo de referencia normal fue insignificante ($< 2,75$ bp).
Inestable	Se detectó inestabilidad de microsatélites en el marcador de repetición de mononucleótidos. Se identificó un nuevo alelo en la muestra tumoral y la diferencia de tamaño entre este alelo y el alelo de referencia normal fue significativa ($\geq 2,75$ bp).
No válido	No se pudo evaluar la inestabilidad de microsatélites en el marcador de repetición de mononucleótidos. La calidad de los datos de la muestra era inaceptable debido a un fallo crítico en el QC (consulte la sección 6.3).

Para cada marcador de repetición de mononucleótidos que supere el QC:



1. Las muestras tumorales a menudo contienen una mezcla de células normales y tumorales; es común la presencia del alelo de referencia normal en la muestra tumoral.
2. Consulte la sección 9, Solución de problemas, para obtener más información.

Figura 11. Guía general para evaluar la estabilidad de los marcadores de repetición de mononucleótidos en las muestras de pacientes. Siga el diagrama de flujo con cada marcador de repetición de mononucleótidos que cumpla los requisitos de QC de los datos especificados en la sección 6.3. Documente la estabilidad de cada marcador y, luego, continúe con la sección 6.5, Interpretación del estado de MSI del tumor. **Nota:** Para interpretar un determinado marcador de repetición de mononucleótidos, se deben superar todas las comprobaciones de QC de ese marcador tanto en las muestras normales como en las tumorales.

6.5 Interpretación del estado de MSI del tumor

6.5.1 Resumen

El proceso de interpretación del estado de MSI de las muestras según las llamadas de estabilidad determinadas para los marcadores del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se resume en la figura 12. En la tabla 7 se recogen los puntos finales para la interpretación del estado de MSI de las muestras tumorales. Este método sigue las reglas de consenso para la determinación del estado de MSI establecidas en el taller sobre inestabilidad de microsatélites del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (Boland, 1998). Cuando no se observa ningún fallo crítico en el QC, el estado de MSI de las muestras se interpreta de la siguiente manera:

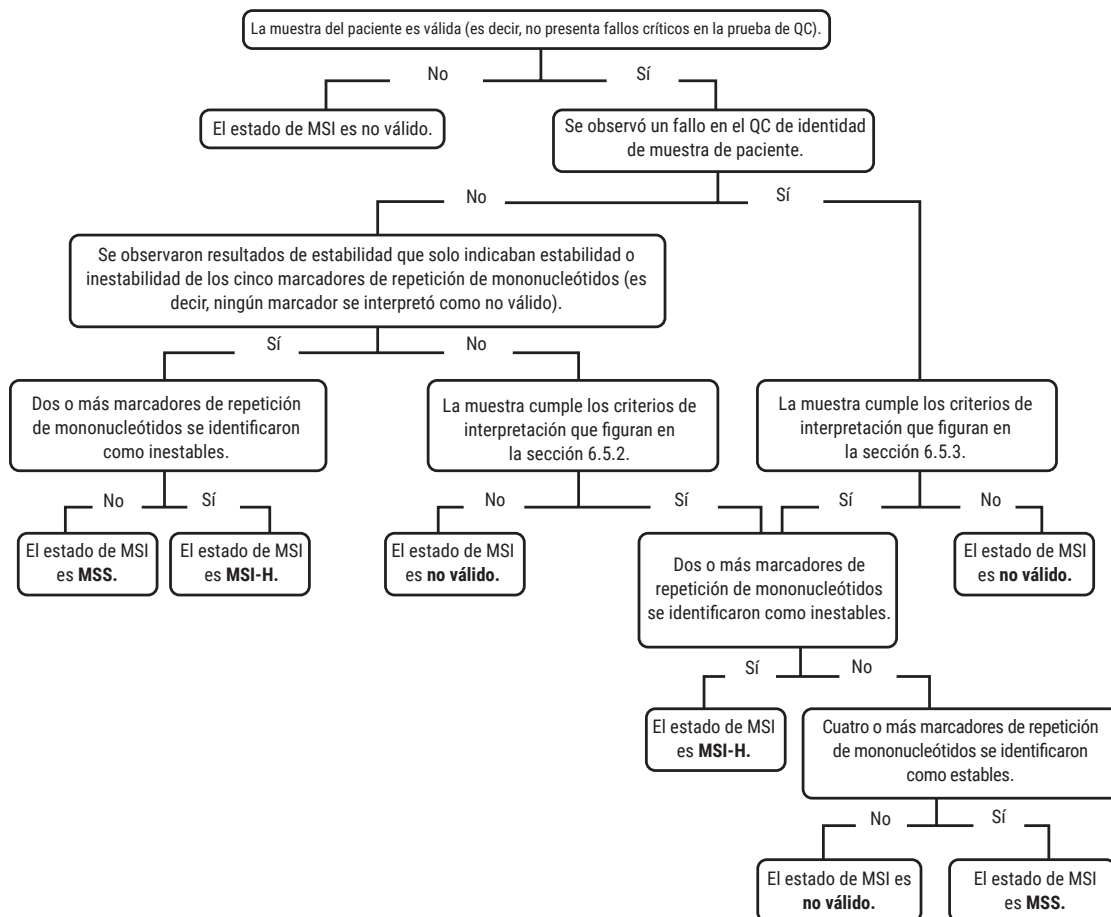
Una muestra tumoral se interpreta como MSI-H cuando dos o más marcadores de repetición de mononucleótidos son inestables. Una muestra tumoral se interpreta como MSS cuando menos de dos marcadores de repetición de mononucleótidos se interpretan como inestables (Boland, 1998; Hampel, 2008; Umar, 2004).

La determinación de MSI sigue siendo posible cuando se obtienen resultados no válidos de un subconjunto de marcadores (consulte la sección 6.5.2) o cuando se observa un fallo en el QC de identidad de muestra de paciente (consulte la sección 6.5.3). Más adelante se ofrece una guía para la interpretación de dichas muestras. Las muestras que presentan menos de dos marcadores válidos de repetición de mononucleótidos no pueden interpretarse y deben tratarse según las directrices proporcionadas en la sección 9.

Tabla 7. Estado de MSI del tumor inferido a partir de la suma de los resultados de estabilidad de los marcadores.

Valor	Descripción
MSS	La MSS (estabilidad de microsatélites) indica que menos de dos marcadores de repetición de mononucleótidos se identificaron como inestables.
MSI-H	La MSI-H (alta inestabilidad de microsatélites) indica que dos o más marcadores de repetición de mononucleótidos se identificaron como inestables.
No válido	Este valor indica que la calidad de los datos de la muestra es inaceptable debido a un fallo crítico en el QC (consulte la tabla 5). No se puede realizar una interpretación de la MSI a partir de estos datos. Si un lote no supera el QC de los datos a causa de un problema con el control de amplificación positivo o negativo, todas sus muestras deben interpretarse como no válidas. Consulte la sección de solución de problemas de este manual para obtener información sobre cómo resolver los fallos de QC que dan lugar a resultados no válidos.

Interpretación del estado de MSI de cada muestra de paciente:



16188MA

Figura 12. Guía general para determinar el estado de MSI de una muestra tumoral. Siga el diagrama de flujo con cada muestra que supere el QC de los datos.

6.5.2 Interpretación de la MSI cuando un subconjunto de marcadores presenta resultados de estabilidad no válidos

Si los picos de intensidad de los alelos de los marcadores de repetición de mononucleótidos son demasiado bajos para la evaluación de los datos, las muestras tendrán fallos en el QC de señal tumoral o el QC de amplificación de alelos y un estado de invalidez con respecto a la estabilidad de los marcadores. Cuando un pico amplio interfiera en el dimensionado de los picos de los alelos, la muestra presentará un fallo en el QC de picos amplios y un estado de invalidez con respecto a la estabilidad de los marcadores.

Si se cumplen las siguientes condiciones, se puede realizar una interpretación de la MSI de una muestra de paciente que presente resultados de estabilidad no válidos en un subconjunto de marcadores de repetición de mononucleótidos:

1. No podría rectificarse la altura baja de los picos de los marcadores mediante a) el aumento de la entrada de ADN en la reacción de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System o b) la repetición del análisis de una sección de tejido FFPE diferente.
2. No se observa ningún fallo de QC en ninguno de los marcadores de repetición de pentanucleótidos.
3. Los únicos fallos de QC de los datos se dan en el QC de señal tumoral, el QC de amplificación de alelos o el QC de picos amplios.
4. Se podría hacer una llamada estable o inestable para dos o más marcadores de repetición de mononucleótidos.

Si se cumplen estas condiciones, la muestra puede interpretarse con los datos de estabilidad válidos restantes siguiendo estas directrices (Boland, 1998):

1. Si dos o más marcadores de repetición de mononucleótidos son inestables, interprete la muestra tumoral como MSI-H.
2. Si cuatro o más marcadores de repetición de mononucleótidos son estables, interprete la muestra tumoral como MSS.
3. En caso contrario, la muestra no puede interpretarse. El estado de MSI de la muestra no será válido.

6.5.3 Interpretación de la MSI cuando se observa un fallo en el QC de identidad de muestra de paciente

En las muestras tumorales, los marcadores pentanucleótidos pueden perder o mostrar alelos adicionales que complican la interpretación de la identidad con las muestras normales. Entre los eventos genéticos comunes observados con tejido tumoral, se incluyen la LOH y la inestabilidad genómica generalizada, que pueden interferir en la autenticación de las muestras (es decir, la confirmación de la identidad entre muestras normales y tumorales emparejadas). Los marcadores de repetición de pentanucleótidos pueden presentar un número diferente de alelos en una muestra tumoral con respecto a la muestra normal emparejada. La presencia de alelos adicionales en una muestra tumoral no provoca un fallo en el QC de los datos.

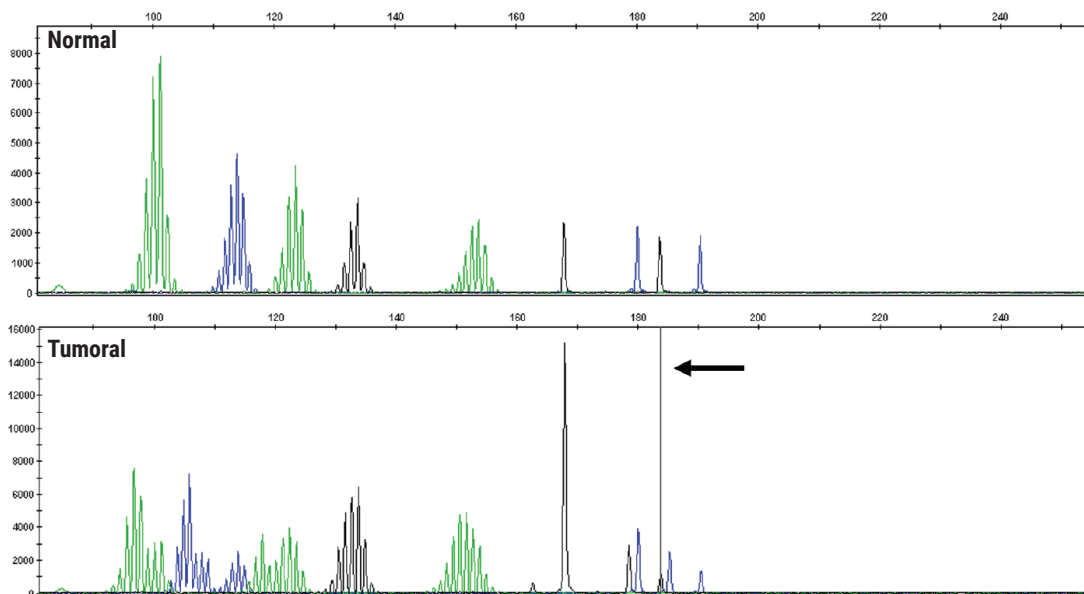
Por otro lado, los casos de desequilibrio alélico pronunciado (por ejemplo, la pérdida de heterocigosidad [LOH]) pueden dar lugar a un alelo pentanucleótido que aparece en la muestra normal, pero que no se llama alelo en la muestra tumoral. Se observa un grave desequilibrio alélico cuando se pierde uno de los alelos pentanucleótidos normales (es decir, se reduce considerablemente la altura de los picos y no se identifica como alelo) en el tumor. Este estado puede ocasionar un aparente fallo en el QC de identidad de muestra de paciente. Para confirmar si un alelo normal “perdido” se encuentra por encima del umbral analítico y el algoritmo de llamadas de alelos del software simplemente lo filtró, abra el archivo de la muestra en el software de análisis de fragmentos y pase el cursor sobre el pico “perdido” en el electroferograma de la muestra tumoral. Al pasar por encima de un pico posiblemente “perdido” en el GeneMapper® Software, aparecerá una línea negra vertical que indica que el pico estaba por encima del umbral analítico, pero se filtró y, por lo tanto, no se identificó como un alelo (figura 13). De manera alternativa, puede ampliar dicho pico “perdido” para asegurarse de que esté por encima del umbral analítico. Si el software de análisis de fragmentos seleccionado no admite esta función, verifique que la altura de los picos del alelo perdido se encuentre por encima del umbral analítico.

Si se cumplen las siguientes condiciones, se puede realizar una interpretación de la MSI de una muestra de paciente que presente un aparente fallo en el QC de identidad de muestra de paciente:

1. El fallo de QC se observó en un solo marcador de repetición de pentanucleótidos (es decir, Penta C o Penta D, no ambos).
2. El alelo normal “perdido” aparece en la muestra tumoral por encima del umbral analítico, pero el algoritmo de llamadas de alelos del software de análisis de fragmentos lo filtró como un artefacto debido a otro alelo con una altura mucho más elevada en el mismo panel.
3. No se observa ningún fallo de QC en los marcadores de repetición de mononucleótidos.

Si se cumplen estas condiciones, los datos pueden interpretarse siguiendo estas directrices:

1. Si dos o más marcadores de repetición de mononucleótidos son inestables, interprete la muestra tumoral como MSI-H.
2. Si cuatro o más marcadores de repetición de mononucleótidos son estables, interprete la muestra tumoral como MSS.



16189TA

Figura 13. Un ejemplo de desequilibrio alélico pronunciado. En caso de desequilibrio alélico pronunciado en los marcadores de repetición de pentanucleótidos, se mostrará una línea negra vertical cuando se pase el cursor sobre un pico normal “perdido” en el electroferograma de la muestra tumoral si este pico está presente y se encuentra por encima del umbral analítico, pero se filtró como un artefacto debido al alelo de 168 bp con una altura de pico mucho más elevada en el mismo panel.

7. Controles de calidad de los análisis

7.1 Calibración espectral

Durante la electroforesis capilar, los productos de amplificación del OncoMate™ MSI Dx Analysis System marcados con colorante se separan por tamaño y se detectan. Antes del análisis, el instrumento de electroforesis capilar elegido se calibra con Matrix Standards para distinguir los colorantes específicos empleados en el análisis. El OncoMate™ 5C Matrix Standard (n.º de cat. de Promega MD3580) consta de fragmentos de ADN marcados con cinco colorantes fluorescentes diferentes (fluoresceína, JOE, TMR-ET, CXR-ET y WEN) en un tubo. Realice una calibración espectral de acuerdo con los parámetros generales proporcionados en el apéndice A (sección 11.1). Una vez generado, el archivo de calibración espectral se aplica automáticamente durante la detección de la muestra para contabilizar el solapamiento espectral entre los colorantes y para separar las señales fluorescentes sin procesar en señales de colorante individuales.

7.2 Muestra de tejido normal emparejada

Los marcadores de repetición de mononucleótidos pueden mostrar heterocigosidad o variación en la longitud del alelo del tejido normal entre los individuos (Bacher, 2004). Para tener en cuenta estas variaciones de los alelos normales, se debe procesar una muestra de tejido normal emparejada en paralelo con cada muestra tumoral. Además, la revisión de la muestra de tejido normal puede ser importante a la hora de evaluar la muestra tumoral para detectar alteraciones sutiles en la longitud del alelo. Las muestras tumorales suelen contener una mezcla de células normales y tumorales. Los alelos tumorales nuevos pueden solaparse con los picos de artefactos del componente celular normal en la muestra tumoral y es posible que se necesite una comparación directa con el tejido normal para interpretar esos datos. Si se debe repetir el análisis de una muestra tumoral o normal por cualquier motivo, la muestra tumoral o normal emparejada también tiene que volver a procesarse para tener en cuenta las posibles variaciones de un análisis a otro.

7.3 Controles positivos y negativos

Las reacciones de amplificación de control positivo y negativo (sin plantilla) que utilizan el 2800M Control DNA y Water, Amplification Grade, respectivamente, deben analizarse simultáneamente con las muestras de los pacientes para verificar el rendimiento del análisis. Debe incluirse al menos una reacción de amplificación con el 2800M Control DNA y una reacción de amplificación de control negativo en cada placa de muestras de pacientes. La reacción de control negativo se analiza para asegurarse de que no se produzca ninguna amplificación inesperada en las reacciones sin plantilla. Una amplificación inesperada en una reacción de control negativo indica contaminación del ADN, que se traduce en un resultado no válido del análisis. Los controles negativos no deberían tener picos amplificados por encima del umbral analítico. La reacción de control positivo se analiza para demostrar que el proceso químico de amplificación se desarrolló según lo previsto. Unos resultados inesperados en un control positivo pueden indicar una amplificación deficiente o fallida. Consulte la tabla 8 para conocer los resultados esperados del 2800M Control DNA.

Tabla 8. Resultados esperados con el uso de 1 ng de 2800M Control DNA.

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

¹ Los tamaños de los alelos se determinaron mediante el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con el POP-7® Polymer y un conjunto de capilares de 50 cm. Los tamaños identificados en otros instrumentos o con configuraciones de consumibles diferentes pueden variar ligeramente.

² La variabilidad diaria y de un instrumento a otro en el rendimiento de los instrumentos de electroforesis capilar puede dar lugar a una diferencia de aproximadamente ± 1 bp en los tamaños esperados de los alelos del 2800M Control DNA.

7.4 Estándares de electroforesis capilar

Todas las muestras y los controles analizados deben contener el Size Standard 500. El Size Standard 500 incluye una serie de 21 fragmentos de ADN de longitudes conocidas (60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450 y 500 bp). Cada fragmento se marca con colorante WEN y se detecta por separado (como cuarto color, naranja) en presencia de los productos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System durante la electroforesis capilar. El Size Standard 500 se emplea para asignar tamaños a los productos amplificados de cada muestra y control mediante el método de Southern local (Southern, 1979). El estándar de tamaño controla las variaciones en la precisión del dimensionado entre los capilares durante la electroforesis capilar y posibilita una comparación directa de las muestras en el análisis por electroforesis capilar. Solo los fragmentos de 60 bp a 300 bp se analizan con el software de análisis de fragmentos seleccionado.

7.5 Umbral analítico

Se debe establecer y aplicar un umbral analítico durante el análisis de los datos con el software de análisis de fragmentos para garantizar la fiabilidad de la interpretación de la MSI. Existen varios métodos para definir un umbral analítico adecuado, que pueden encontrarse en la documentación publicada (por ejemplo, Bregu, 2013). Durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System, se determinó que el umbral analítico fuera de 175 RFU mediante el enfoque del límite superior, que se basa en la regresión lineal de los picos de intensidad generados a partir de muestras que contienen diferentes entradas de ADN (Bregu, 2013).

8. Limitaciones específicas

El contenido tumoral de las muestras tumorales puede afectar a la capacidad del software de dimensionado de fragmentos para identificar un alelo. El contenido tumoral debe ser $\geq 20\%$ y debe haber suficiente cantidad de células nucleadas, según la caracterización patológica estándar. Las muestras tumorales que no cumplen estos criterios no son adecuadas para utilizarse con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

El OncoMate™ MSI Dx Analysis System se evaluó con ADN de entrada purificado procedente de muestras de tejido FFPE de colon mediante el Maxwell® CSC Instrument y el Maxwell® CSC FFPE DNA Kit, seguido de un análisis de los productos de amplificación a través del Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer con el GeneMapper® Software (versión 5.0). Antes de usar otros métodos de extracción de ADN, instrumentos de electroforesis capilar, programas de software de análisis de fragmentos o métodos de análisis, el usuario debe determinar si tales métodos son apropiados para su utilización con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

El software de dimensionado de fragmentos cuenta con diferentes capacidades para identificar un alelo tumoral alterado o un patrón de marcadores microsatélites. Compare la muestra tumoral con una muestra de tejido normal del mismo paciente para realizar una interpretación precisa.

Los locus microsatélites incluidos en el sistema son cuasimonomórficos. En casos aislados, se han observado patrones de alelos heterocigóticos. Compare la muestra tumoral con una muestra de tejido normal del mismo paciente para realizar una interpretación precisa.

El mantenimiento de los instrumentos y accesorios empleados con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System debe realizarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; asimismo, estos deben cumplir los criterios definidos para su uso con este producto.

9. Solución de problemas

Si tiene preguntas que no se han planteado aquí, consulte la guía del usuario del instrumento o accesorio aplicable, o bien póngase en contacto con la oficina o el distribuidor local de Promega. Puede obtener información de contacto en www.promega.com. Correo electrónico: genetic@promega.com.

Síntomas	Causas y comentarios
Los fragmentos del Size Standard 500 presentaron una baja resolución, menos fragmentos de lo esperado o picos de intensidad reducidos, lo que provocó un fallo en el QC de calidad del dimensionado (los amplicones también pueden verse afectados).	Había burbujas en los líquidos del instrumento. Siga el procedimiento del fabricante del instrumento para eliminar las burbujas de los líquidos del instrumento y, después, repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas, incluidos los controles positivos y negativos. Había contaminantes o restos de cristal en el polímero. Cuando reponga el polímero, asegúrese de que esté a temperatura ambiente como indica el fabricante. Repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas, incluidos los controles positivos y negativos. Se han bloqueado uno o más capilares. Rellene el conjunto de capilares y repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas, incluidos los controles positivos y negativos. Es posible que deba instalar un nuevo conjunto de capilares. El Size Standard 500 no se añadió a la mezcla de carga de la electroforesis capilar. Prepare una nueva mezcla de carga de electroforesis capilar que incluya el Size Standard 500 y repita el análisis por electroforesis capilar con todas las muestras y controles. Las puntas de los capilares no estaban en contacto con la mezcla de carga. Asegúrese de que los 11 µl de la combinación de la mezcla de carga y la muestra se hayan añadido a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y de que esta se haya centrifugado brevemente antes de iniciar el análisis por electroforesis capilar. Repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas, incluidos los controles positivos y negativos. Revise el electroferograma para solucionar la causa raíz del indicador del QC de calidad del dimensionado.

Síntomas	Causas y comentarios
El análisis por electroforesis capilar no se inició cuando se indicó.	Había burbujas en los líquidos del instrumento de electroforesis capilar. Siga las instrucciones del fabricante para eliminar las burbujas. Reinicie el análisis por electroforesis capilar. Se ha producido un error en el ordenador del sistema. Reinicie el instrumento de electroforesis capilar y el ordenador del instrumento según las instrucciones del fabricante y, a continuación, vuelva a iniciar el análisis por electroforesis capilar. Uno o más consumibles del instrumento han caducado o han alcanzado el límite de muestra. Sustituya los consumibles caducados o agotados y, a continuación, reinicie el análisis por electroforesis capilar.
Se detectaron picos inesperados en el canal de colorante del Size Standard 500, lo que provocó un fallo en el QC de calidad del dimensionado.	Hay artefactos relacionados con la electroforesis capilar. Se pueden observar picos anómalos durante dicha técnica. Cuando estos afectan al canal de colorante naranja, los picos del Size Standard 500 pueden quedar oscurecidos o el software de análisis de fragmentos puede asignar incorrectamente los tamaños. Repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas, incluidos los controles positivos y negativos. Cambie los consumibles de la electroforesis capilar si el problema no desaparece. Revise el electroferograma para solucionar la causa raíz del indicador del QC de calidad del dimensionado.
Se observó una amplificación deficiente o un desequilibrio entre los marcadores en las intensidades de los alelos con respecto a la reacción de amplificación del 2800M Control DNA (las muestras también pueden verse afectadas).	La solución madre del 2800M Control DNA o la dilución del 2800M Control DNA no estaban suficientemente mezcladas en vórtex. Se pueden observar picos de intensidad bajos o excesivos, incluida una amplificación excesiva de los alelos del marcador Penta D. Repita las reacciones de amplificación y el análisis por electroforesis capilar, incluidos los controles positivos y negativos. La mezcla de amplificación de PCR no estaba suficientemente mezclada en vórtex. Repita las reacciones de amplificación y el análisis por electroforesis capilar, incluidos los controles positivos y negativos.

Síntomas	Causas y comentarios
Se observó una amplificación deficiente o un desequilibrio entre los marcadores en las intensidades de los alelos con respecto a la reacción de amplificación del 2800M Control DNA (las muestras también pueden verse afectadas). (continuación)	La dilución del 2800M Control DNA se preparó previamente y se reutilizó. Prepare una nueva dilución del 2800M Control DNA y repita las reacciones de amplificación y el análisis por electroforesis capilar, incluida una muestra de control positivo recién preparada y un control negativo.
Altura baja de los picos en las muestras normales o tumorales. Las muestras tumorales pueden presentar un fallo en el QC de señal tumoral.	Plantilla de ADN insuficiente. La baja altura de los picos puede interferir en la interpretación de los datos. Los picos de intensidad de los alelos de las muestras tumorales deben ser lo suficientemente elevados como para garantizar que se detecten nuevos alelos por encima del umbral analítico (consulte la sección 6.3.10). Las intensidades de los alelos de las muestras normales deben ser iguales o superiores al umbral analítico. Asegúrese de que el ADN se haya cuantificado y diluido con precisión, y repita la amplificación utilizando 1,0 ng de plantilla de ADN si se detecta un error de cuantificación. En caso contrario, repita la amplificación con más ADN. Si el problema continúa, repita el análisis con ADN preparado a partir de una sección de tejido diferente. Plantilla de ADN impura. Las impurezas en las muestras de ADN pueden inhibir la PCR. Consulte las instrucciones del fabricante del método de extracción de ADN elegido para obtener orientación. Es posible que tenga que cambiar a otro método de extracción de ADN si no puede obtenerse una calidad suficiente del ADN. La evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System se realizó con ADN purificado de muestras de tejido FFPE de CRC mediante el Maxwell® CSC Instrument y el Maxwell® CSC FFPE DNA Kit. Puede que otros métodos no proporcionen la misma calidad de ADN. Inyección de electroforesis capilar deficiente (los picos del Size Standard 500 también se ven afectados). Repita el análisis por electroforesis capilar con las muestras afectadas y los controles positivos y negativos. Se utilizó formamida de baja calidad. Use únicamente la Hi-Di™ 3500 Dx Series Formamide.

Síntomas

Altura baja de los picos en las muestras normales o tumorales. Las muestras tumorales pueden presentar un fallo en el QC de señal tumoral. (continuación)

Causas y comentarios

Alta concentración de sal o pH alterado. No diluya la plantilla de ADN FFPE en tampones de TE. Emplee exclusivamente agua sin nucleasa para diluir la plantilla de ADN.

Problemas con el termociclador o la placa de reacción (la reacción de control positivo también se vio afectada). Confirme que el programa de PCR sea correcto y que el termociclador seleccionado cumpla los requisitos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System (consulte la sección 3.5). Puede que se requiera una calibración del bloque calefactado. Utilice solo placas MicroAmp®.

Las muestras no se desnaturalizaron adecuadamente antes de la electroforesis capilar. Desnaturalice las muestras por calor durante 3 minutos y déjelas enfriar en hielo picado o en un baño de agua con hielo durante, como mínimo, 3 minutos inmediatamente antes de la CE.

ADN de baja calidad o degradado. La fijación incorrecta o prolongada de muestras incrustadas en parafina puede dar lugar a resultados deficientes del ADN y un ADN de baja calidad. La conservación inadecuada del ADN después de una extracción correcta también puede provocar la degradación del ADN. Repita la amplificación con más ADN o la preparación de este con una sección de tejido diferente.

Los componentes de la reacción de amplificación no se añadieron al fondo del pocillo durante la configuración de la PCR. Antes del ciclo térmico, centrifugue la placa brevemente en una minicentrífuga de placas para llevar el contenido al fondo de los pocillos y eliminar las burbujas de aire.

Síntomas

La señal fluorescente de los picos de los alelos superó el rango dinámico del instrumento de electroforesis capilar seleccionado.

Causas y comentarios

Demasiada plantilla de ADN. Asegúrese de que el ADN se haya cuantificado y diluido con precisión. Repita la amplificación utilizando 1,0 ng de plantilla de ADN si se detecta un error de cuantificación. En caso contrario, adopte uno de los siguientes enfoques: 1) repita la reacción de amplificación con menos ADN o 2) diluya los productos de amplificación con una proporción de 1:8 en la mezcla de carga (por ejemplo, 1 µl de productos de amplificación más 7 µl de mezcla de carga; consulte la tabla 4 para conocer la composición de la mezcla de carga) y repita el análisis por electroforesis capilar con 1 µl de los productos de amplificación diluidos. Asegúrese de que el método de extracción de ADN resulte adecuado para las muestras de tejido FFPE y de que el ADN se haya conservado de modo apropiado para el método empleado.

El ADN de la muestra FFPE se ha degradado o entrecruzado. Las plantillas de ADN FFPE degradadas o entrecruzadas pueden presentar una amplificación preferente de marcadores más pequeños, en particular, del marcador NR-21. Verifique las condiciones correctas de preparación de las muestras FFPE y las condiciones de conservación de los extractos de ADN FFPE. Se puede adoptar uno de los siguientes enfoques para tratar las muestras fuera de escala: 1) repita la reacción de amplificación con menos ADN o 2) diluya los productos de amplificación con una proporción de 1:8 en la mezcla de carga (por ejemplo, 1 µl de productos de amplificación más 7 µl de mezcla de carga; consulte la tabla 4 para conocer la composición de la mezcla de carga) y repita el análisis por electroforesis capilar con 1 µl de los productos de amplificación diluidos. Si el problema no se resuelve, repita la amplificación con menos ADN. Es posible que tenga que repetir la preparación y el análisis del ADN con una sección de tejido diferente.

Síntomas

Los picos inesperados eran visibles en uno o más colorantes.

Causas y comentarios

Los picos de artefactos se confundieron con alelos microsatélites. La amplificación de los marcadores microsatélites genera artefactos que aparecen como picos más pequeños 1 bp por encima o por debajo de los alelos de repetición de mononucleótidos destacados o 1 bp o 5 bp por encima o por debajo de los alelos de repetición de pentanucleótidos. La altura de los picos de los productos de artefacto será más alta si se utiliza demasiada plantilla de ADN.

Exceso de ADN. Use 1,0 ng de plantilla de ADN. La amplificación de >4 ng de plantilla de ADN puede derivar en artefactos basales elevados en el marcador BAT-26 y un mayor número de picos de artefactos.

Exceso de traspaso. El exceso de traspaso puede darse cuando la altura de los picos es desmesurada o la calidad de la calibración espectral es deficiente. Repita la calibración espectral del instrumento de electroforesis capilar seleccionado. Asegúrese de que el ADN se haya cuantificado y diluido con precisión. Repita la amplificación con 1,0 ng de plantilla de ADN. Si el problema no se resuelve, repita la amplificación con menos ADN.

Las muestras no se desnaturalizaron adecuadamente antes de la carga. Desnaturalice las muestras por calor durante 3 minutos y déjelas enfriar en hielo picado o en un baño de agua con hielo durante, como mínimo, 3 minutos inmediatamente antes de la electroforesis capilar.

Hay artefactos relacionados con la electroforesis capilar. Se pueden observar picos anómalos durante dicha técnica. Asegúrese de que el polímero se caliente a temperatura ambiente antes de su instalación y uso. Repita las inyecciones. Repita la amplificación y la electroforesis capilar si el problema no desaparece.

Contaminación de la muestra de control o de paciente con otra plantilla de ADN o producto amplificado. La contaminación cruzada puede suponer un problema. Utilice puntas de pipeta resistentes a los aerosoles y cámbiese los guantes con regularidad.

Síntomas

Los picos inesperados eran visibles en uno o mas colorantes. (continuacion)

Causas y comentarios

Una muestra tumoral inestable se analizó por error como una muestra normal de referencia. Verifique que las muestras se hayan identificado y etiquetado correctamente. Repita la amplificación y el análisis por electroforesis capilar de las muestras afectadas para confirmar la sospecha de la causa raíz.

Amplificación preferente de marcadores más pequeños.

El ADN se ha entrecruzado. El ADN preparado a partir de muestras fijadas mediante formalina e incrustadas en parafina suele entrecruzarse con otras moléculas de proteínas o ADN, lo que impide la amplificación de fragmentos de ADN más largos. Repita la amplificación con más ADN. Si con una mayor cantidad de ADN se observa saturación de los marcadores más pequeños, repita la extracción de ADN y el análisis de la muestra utilizando una sección de tejido diferente. Si el problema no se resuelve, puede que la calidad de la muestra de tejido FFPE sea demasiado baja para que el análisis se realice correctamente.

El ADN se ha degradado. La plantilla de ADN se ha degradado en fragmentos más pequeños y los marcadores con un mayor tamaño han mostrado una disminución del rendimiento. Verifique las condiciones correctas de conservación del 2800M Control DNA y las muestras de ADN FFPE. Repita la reacción de amplificación con más ADN. Si con una mayor cantidad de ADN se observa saturación de los marcadores más pequeños, repita la extracción de ADN y el análisis de la muestra utilizando una sección de tejido diferente. Si el problema no se resuelve, puede que la calidad de la muestra de tejido FFPE sea demasiado baja para que el análisis se realice correctamente.

Plantilla de ADN insuficiente. Asegúrese de que el ADN se haya cuantificado y diluido con precisión, y repita la amplificación utilizando 1,0 ng de plantilla de ADN si se detecta un error de cuantificación. Si el problema no se resuelve, repita la reacción de amplificación con más ADN o la preparación de este con una sección de tejido diferente.

Síntomas

Uno o más alelos pentanucleótidos presentes en la muestra normal no aparecían en la muestra tumoral.

Causas y comentarios

Se analizaron muestras de ADN normales y tumorales de distintos individuos como un par de muestras. Asegúrese de que las muestras normales o tumorales de la muestra tumoral se hayan emparejado correctamente en la placa de PCR y durante el análisis por electroforesis capilar. Cerciórese de que las muestras se hayan etiquetado adecuadamente. Repita el análisis por electroforesis capilar de las muestras afectadas con el emparejamiento apropiado, incluidas las reacciones de control positivo y negativo. Si el problema no desaparece, repita las reacciones de amplificación.

La muestra tumoral presenta pérdida de heterocigosidad. Consulte la sección 6.5.3 y la figura 13 para obtener más información sobre la interpretación de los datos de estas muestras tumorales.

10. Bibliografía

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

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



11. Información adicional

Puede obtener información de contacto en **www.promega.com**. Correo electrónico: **genetic@promega.com**.

11.1 Apéndice A

A continuación se muestran los ajustes de calibración espectral empleados durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System con el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.

Los siguientes ajustes resultan adecuados para realizar la calibración espectral con los Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers:

Dye set template (Plantilla de conjunto de colorantes): AnyDye (Cualquier colorante) (3500 Series)

Dye order (Orden de colorantes): 5, blue (azul); 4, green (verde); 3, yellow (amarillo); 2, red (rojo); 1, orange (naranja) (purple [púrpura] no seleccionado)

Matrix Condition Number Upper Limit (Límite máximo del número de condiciones de la matriz): 8,0

Locate Start Point After Scan (Búsqueda de punto de partida tras el análisis): 300

Locate Start Point Before Scan (Búsqueda de punto de partida antes del análisis): 5000

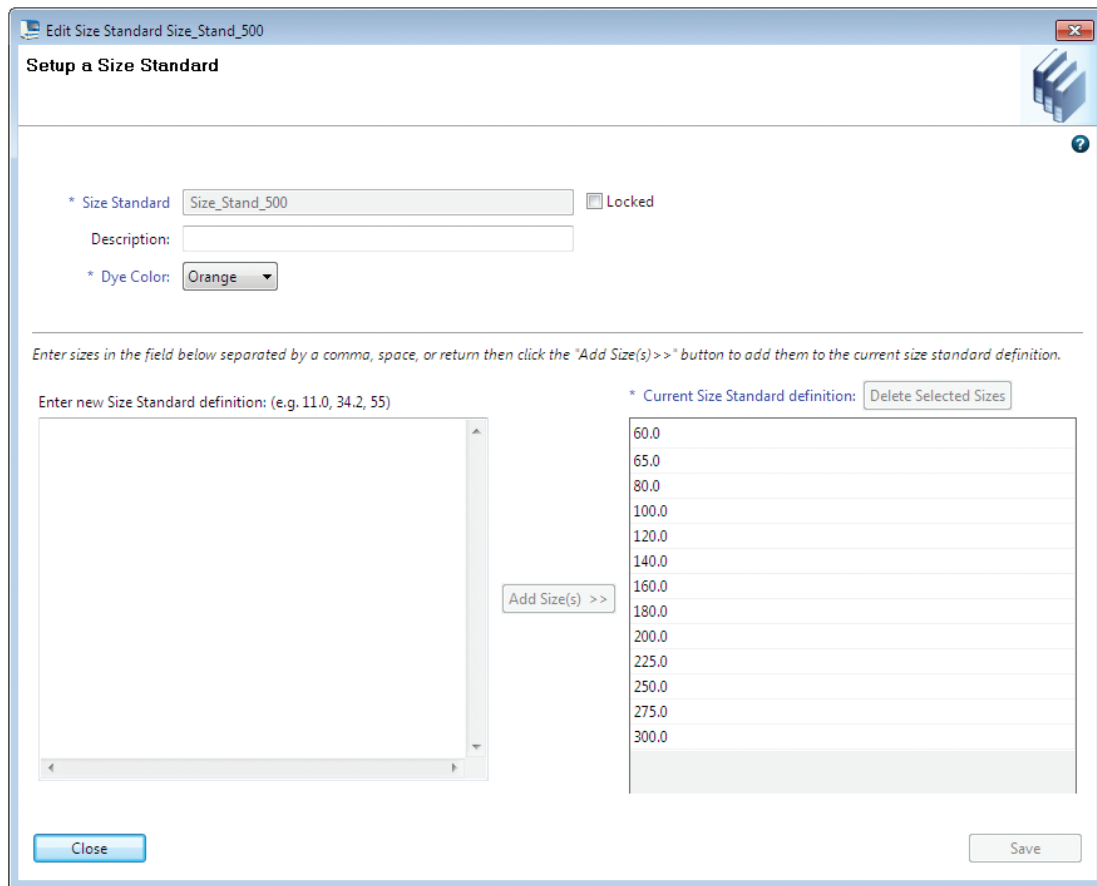
Limit Scans To (Limitación de análisis a): 6500

Sensitivity (Sensibilidad): 0,4

Minimum Quality Score (Puntuación mínima de calidad): 0,95

11.2 Apéndice B

A continuación se muestran los ajustes de análisis de fragmentos empleados durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System con el Applied Biosystems® 3500 Dx Genetic Analyzer.



16190TA

Figura 14. Definición de “Size Standard” (Estándar de tamaño) en el instrumento de electroforesis capilar.

Edit Instrument Protocol FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDye_11s

Setup an Instrument Protocol

Instrument Protocol Setup Help ?

Application Type: Fragment Capillary Length: 50 cm Polymer: POP7

Dye Set: OncoMate_MSI ☐ Disable Name Filter

Instrument Protocol Properties

* Run Module: FragmentAnalysis50_POP7 Run Modules for 8 capillary are only available in the list.

* Protocol Name: FragmentAnalysis50_POP7_MSI_AnyDye_11s ☐ Locked

Description: 11s injection time; for use with 50cm capillary array and POP-7 polymer.

Oven Temperature (°C): 60 Run Voltage (kVolts): 19.5 PreRun Voltage (kVolts): 15 Injection Voltage (kVolts): 1.6

Run Time (sec.): 1330 PreRun Time (sec.): 180 Injection Time (sec.): 11 Data Delay (sec.): 1

▼ Advanced Options

Following values are not recommended to be changed.

Voltage Tolerance (kVolts): 0.7 Voltage # of Steps (nk): 30 Voltage Step Interval (sec.): 15

First Read Out Time (ms): 200 Second Read Out Time (ms): 200

Normalization Target: 4500.0 Normalization Factor Threshold Min: 0.3 Normalization Factor Threshold Max: 3.0

Close Save

16191TA

Figura 15. Configuración de “Instrument Protocol” (Protocolo del instrumento) en el instrumento de electroforesis capilar.

16192TA

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

Figura 16. Configuración de “Sizecalling Protocol” (Protocolo de llamadas de tamaños) en el instrumento de electroforesis capilar.

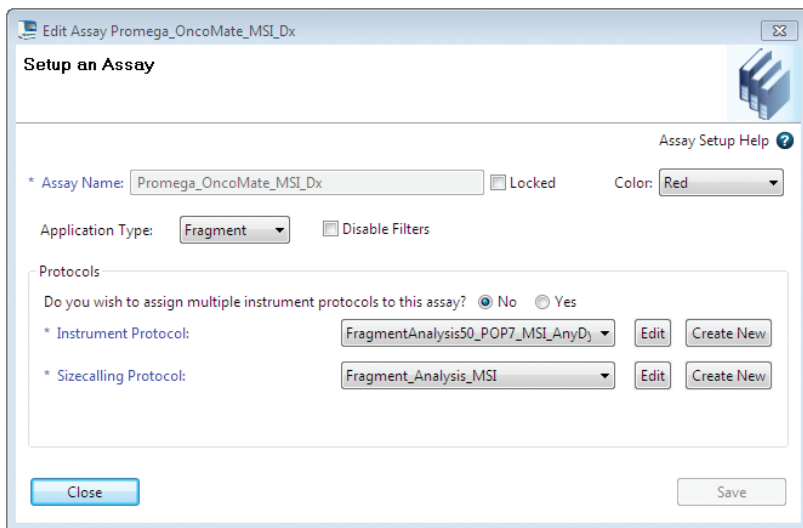


Figura 17. Configuración de “Assay” (Análisis) en el instrumento de electroforesis capilar.

11.3 Apéndice C

Ajustes de análisis de datos de GeneMapper® 5.0 empleados durante la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

Nota: Los archivos de configuración y las instrucciones de análisis de datos de GeneMapper® se facilitan al usuario para su comodidad y se aplican específicamente a los datos de electroforesis capilar generados con un conjunto de 50 cm y el POP-7® Polymer. Los usuarios que analicen productos amplificados del OncoMate™ MSI Dx Analysis System con otras configuraciones del instrumento de electroforesis capilar deben verificar la idoneidad de las instrucciones de análisis de datos para su configuración concreta. Los métodos de análisis creados por el usuario pueden ser más apropiados para unos ajustes determinados.

Importación de archivos de configuración para GeneMapper

Para facilitar el análisis de los datos generados con el OncoMate™ MSI Dx Analysis System, hemos creado unos archivos (Panels [Paneles], Analysis Method [Método de análisis], Size Standard [Estándar de tamaño], Plot Settings [Configuración de gráficos], Table Settings [Configuración de tablas] y Report Settings [Configuración de informes]) para importarlos en el GeneMapper® Software (versiones 5.0 y 6.0). Pueden obtenerse en el sitio web de Promega: **www.promega.com/OncomatePanels**. A continuación también se presentan las definiciones de Panels (Paneles), Size Standard (Estándar de tamaño) y Analysis Method (Método de análisis) (tablas 9 y 10, y figura 19). Consulte la documentación relacionada con el GeneMapper® Software (versiones 5.0 y 6.0) para obtener más información.

1. Abra el GeneMapper® Software (versión 5.0 o 6.0).
2. Seleccione **Tools** (Herramientas) y, a continuación, **Panel Manager** (Administrador de paneles).
3. Seleccione **Panel Manager** (Administrador de paneles) en el panel superior izquierdo (figura 18).
4. En el menú, seleccione **File** (Archivo) y, después, **Import Panels** (Importar paneles). El icono Panel Manager (Administrador de paneles) debe estar seleccionado (resaltado en azul) para que la opción **Import Panels** (Importar paneles) se pueda seleccionar.
5. Vaya a la ubicación del ordenador donde se guardó el archivo de texto de los paneles. Seleccione el archivo **OncoMate_MSI_Dx_Panels_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Paneles_v1.0) y, a continuación, **Import** (Importar).
6. En la parte inferior de la ventana Panel Manager (Administrador de paneles), seleccione **Apply** (Aplicar) y, luego, **OK** (Aceptar).
7. Seleccione **Tools** (Herramientas) y, a continuación, **GeneMapper Manager** (Administrador de GeneMapper).
8. Seleccione la pestaña “Size Standards” (Estándares de tamaño) y, después, **Import** (Importar) en la parte inferior de la ventana GeneMapper Manager (Administrador de GeneMapper).
9. Vaya a la ubicación del ordenador donde se guardó el archivo Size Standard (Estándar de tamaño). Seleccione el archivo **OncoMate_MSI_Dx_Size_v1.0** (OncoMate_MSI_Dx_Tamaño_v1.0) y, a continuación, **Import** (Importar).

10. Con la ventana GeneMapper Manager (Administrador de GeneMapper) aún abierta, repita el proceso descrito en los pasos 8 y 9 para importar los demás archivos de configuración (Analysis Method [Método de análisis], Plot Settings [Configuración de gráficos], Table Settings [Configuración de tablas] y Report Settings [Configuración de informes]).
11. Cuando se importen todos los archivos de configuración, seleccione **Done** (Hecho) en la parte inferior de la ventana GeneMapper Manager (Administrador de GeneMapper).

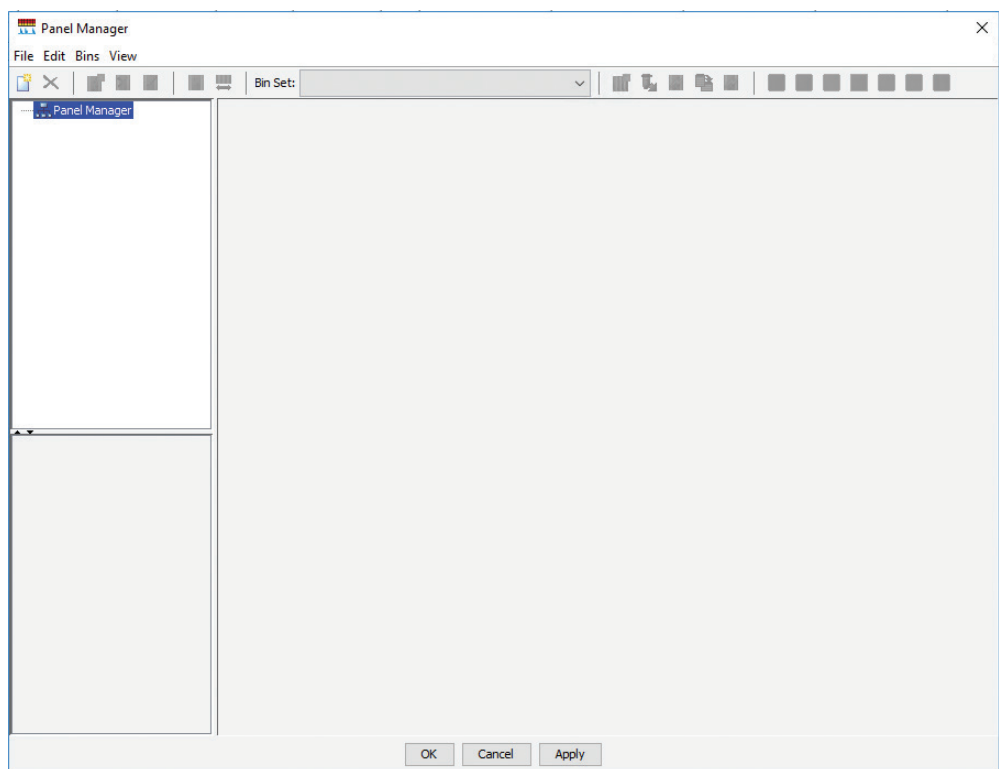


Figura 18. La ventana Panel Manager (Administrador de paneles) de GeneMapper®, con el icono Panel Manager (Administrador de paneles) seleccionado. A la opción “Import Panels” (Importar paneles) (paso 4) se puede acceder desde el menú “File” (Archivo) cuando el icono Panel Manager (Administrador de paneles) está seleccionado (resaltado en azul).

Tabla 9. Definición de Marker Panel (Panel de marcadores).

Marcador	Canal de colorante	Rango de panel (bp) ¹		Tipo de repetición ²
		Inicio	Fin	
BAT-26	Azul	83	121	1
Penta D	Azul	123	253	5
NR-21	Verde	83	108	1
BAT-25	Verde	110	132	1
MONO-27	Verde	134	168	1
NR-24	Amarillo	103	138	1
Penta C	Amarillo	140	228	5

¹ El rango de tamaño esperado de los amplicones de cada marcador debe definirse en el software de análisis de fragmentos seleccionado.

² El tipo de microsatélite se define en esta tabla como 1 (para los marcadores de repetición de mononucleótidos) y 5 (para los marcadores de repetición de pentanucleótidos).

Tabla 10. Definición del Size Standard. El Size Standard 500 contiene picos de fragmentos de 60 bp a 500 bp, aunque basta con un análisis de los picos de fragmentos de 60 bp a 300 bp para dimensionar los fragmentos del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

N.º de fragmentos del Size Standard	Tamaño de los fragmentos (bp)
1	60
2	65
3	80
4	100
5	120
6	140
7	160
8	180
9	200
10	225
11	250
12	275
13	300

Analysis Method Editor - Microsatellite

General

Allele

Peak Detector

Peak Quality

Quality Flags

Bin Set: None

Marker Repeat Type

☐ Use marker-specific stutter ratio if available

Values for dinucleotide repeats are calculated automatically.

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

Range Filter...

Factory Defaults

OK

Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General

Allele

Peak Detector

Peak Quality

Quality Flags

Peak Detection Algorithm: Advanced

Ranges

Analysis

Full Range

Start Pt: 300
Stop Pt: 10000

Sizing

All Sizes

Start Size: 50
Stop Size: 1000

Smoothing and Baselineing

Smoothing

☒ None
☐ Light
☐ Heavy

Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

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

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:

B: 175
G: 175
Y: 175

R: 175
P: 175
O: 175

Min. Peak Half Width: 2 pts

Polynomial Degree: 3

Peak Window Size: 11 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0

Peak End: 0.0

Size Standard Normalization

☐ Enable Normalization

Note: For 35XX series data collection normalization only.

Factory Defaults

OK

Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General

Allele

Peak Detector

Peak Quality

Quality Flags

Signal level

Homozygous min peak height: 200.0

Heterozygous min peak height: 100.0

Heterozygote balance

Min peak height ratio: 0.5

Peak morphology

Max peak width (basepairs): 0.75

Pull-up peak

Pull-up ratio: 0.1

Pull-up scan: 1

Allele number

Max expected alleles: 2

Cross-talk peak

Cross-talk ratio: 0.05

Factory Defaults

OK

Cancel

Analysis Method Editor - Microsatellite

General

Allele

Peak Detector

Peak Quality

Quality Flags

Quality weights are between 0 and 1.

Quality Flag Settings

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

PQV Thresholds

Pass Range:

Low Quality Range:

Sizing Quality:

From 0.75 to 1.0

From 0.0 to 0.25

Genotype Quality:

From 0.75 to 1.0

From 0.0 to 0.25

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

Factory Defaults

OK

Cancel

Figura 19. Ajustes de análisis empleados para la evaluación del rendimiento del OncoMate™ MSI Dx Analysis System.

72 Promega Corporation 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 EE. UU. · Teléfono gratuito en EE. UU. 800-356-9526 · 608-274-4330 · Fax 608-277-2516
TM595 · Rev. 0 www.promega.com

16195TA

^(a) Número de patente de EE. UU. 9 139 868, número de patente europea 2972229 y otras patentes pendientes.

^(b) Los colorantes TMR-ET, CXR-ET y WEN están patentados.

© 2019 Promega Corporation. Todos los derechos reservados.

GoTaq y Maxwell son marcas registradas de Promega Corporation. OncoMate es una marca comercial de Promega Corporation.

Applied Biosystems, GeneMapper y Veriti son marcas registradas de Applied Biosystems. MasterCycler es una marca registrada de Eppendorf. Hi-Di es una marca comercial de Applied Biosystems. C1000 Touch es una marca comercial de Bio-Rad Laboratories, Inc. MicroAmp y POP-7 son marcas registradas de Thermo Fisher Scientific.

Estos productos están protegidos mediante patente solicitada o pendiente, o pueden incluir algunas limitaciones. Para obtener más información, visite nuestro sitio web. Todos los precios y especificaciones de este manual están sujetos a cambios sin previo aviso.

Las declaraciones sobre los productos están sujetas a cualquier cambio. Póngase en contacto con los Servicios técnicos de Promega o acceda al catálogo en línea de Promega para obtener la información más actual sobre los productos Promega.