



AlphaCapillary MSI Scheda Tecnica

Prodotto: AlphaCapillary MSI
Codice prodotto: CP- 701.50.30
Adempimenti regolatori: IVDD 98/79/CE
N° Tests: 50

Destinazione d'uso - Impatto clinico

I microsatelliti sono corte sequenze mono-, di-, tri- e tetra-nucleotidiche di DNA ripetute. Queste ripetizioni sono distribuite lungo tutto il genoma umano e variano spesso in lunghezza da un individuo all'altro a causa delle differenze nel numero di ripetizioni tandem in ciascun locus. L'inserzione o la delezione di unità ripetitive può dar luogo a un'aberrante lunghezza dei microsatelliti definita come instabilità microsatellitare (MSI).

Secondo le stime l'incidenza mondiale annua di tumore al colon e allo stomaco è pari a 945.000 casi accertati e 876.000 nuovi casi nel 2000. Il fenotipo MSI è presente in circa il 10-15% dei tumori sporadici al colon e allo stomaco, ma anche in una grande maggioranza delle sindromi tumorali ereditarie come il carcinoma coloretale ereditario non associato a poliposi (HNPCC).

Durante la fase di replicazione del DNA, errori di misappaiamento avvengono più frequentemente a livello di sequenze ripetute, come i microsatelliti. Il fenotipo MSI può quindi essere interpretato come un marcatore di una latente inefficienza del sistema di riparazione degli errori di misappaiamento (MMR).

I tumori al colon e allo stomaco con MSI presentano profili molecolari e clinico-patologici diversi e sono spesso associati a prognosi favorevole. Studi clinici hanno osservato come i pazienti affetti da tumore coloretale con MSI mostrino una buona sopravvivenza alla chemioterapia a base di 5-Fluoro Uracile (5-FU), suggerendo per l'analisi del fenotipo MSI un ruolo predittivo per la risposta a questo tipo di terapia ausiliaria.

Inoltre, l'analisi di routine di MSI è di supporto nella diagnosi di casi sospetti di carcinoma coloretale ereditario non associato a poliposi (HNPCC).

Nel 1997 un workshop dell'Istituto Nazionale sui Tumori (NCI) ha raccomandato un pannello di 5 marcatori microsatellitari per la rilevazione del fenotipo MSI che consistono in ripetizioni di due marcatori mononucleotidici e di tre marcatori dinucleotidici. Campioni con instabilità di due o più di questi marcatori sono definiti come MSI-High (MSI-H), mentre quelli con un solo marcatore instabile sono definiti come MSI-Low (MSI-L). I campioni in cui non sono state individuate alterazioni sono MSI stabili (MSS). Il workshop NCI del 2002 ha rivisto le raccomandazioni per la rilevazione del fenotipo MSI e si è consigliato di aggiungere marcatori di ripetizioni mononucleotidiche per migliorare la sensibilità e la specificità nell'individuazione dell'MSI.

L'analisi dell'MSI può quindi essere utilizzata come metodo di screening per identificare i campioni per un'ulteriore caratterizzazione.

Umar A. et. al. hanno definito la seguente classificazione del fenotipo MS:

- 1) l'MSI-H, in cui almeno il 40% dei marcatori microsatellitari utilizzati per l'analisi dimostrano instabilità
- 2) l'MSI-L, in cui il meno del 40% dei marcatori microsatellitari utilizzati per l'analisi dimostrano instabilità
- 3) l'MSS: tumori con fenotipo stabile dei microsatelliti.

Per questa classificazione sono necessari i risultati dell'analisi di quattro marcatori dinucleotidici e sei mononucleotidici sono necessari per la classificazione.

Principio del metodo

I laboratori Alphagenics Biotech hanno sviluppato un saggio facile e robusto per MSI in grado di rilevare una serie di dieci marcatori di instabilità microsatellitare (sei mononucleotidici e quattro dinucleotidici) elencati nella tabella sottostante:

Marcatore	Multiplex	Capillari	Mappa cromosomica	Mappa ripetizioni	Lunghezza (bp)	Fluoroforo
BAT26	1	1	2p21-22	A(26)	122-128	HEX
D17S250	1	1	17q12	CA(n)	144-158	FAM
TGF-BetaR	1	1	3p22	A(n)	172-176	HEX
D2S123	1	1	2p15	CA(n)	206-220	FAM
D5S346	1	1	5q22-23	CA(n)	250-265	HEX
CSF1PO	1	1	5q33.3-34	TGAT(n)	299-323	FAM
MybT22	2	2	6q22-q23	T(22)	90-100	HEX
BAT25	2	2	4q12	T(25)	108-115	FAM
D18S58	2	2	18q23	CA(n)	159-169	HEX
Mt1xT20	2	2	16q13	T(20)	180-190	FAM
D7S820	2	2	7p21.1	TAGA(n)	198-222	HEX
BAT40	2	2	1p12-13.3	A(40)	240-255	FAM
D18S51	2	2	18q21.33	GAAA(n)	274-318	HEX

CSF1PO, D18S51 e D7S820 sono marcatori tetra-nucleotidici utilizzati di solito in ambito forense. Solitamente stabili anche nei tumori MSI-H, sono utili per individuare la presenza di DNA contaminato e per confermare che il tumore e i campioni normali corrispondenti provengano dallo stesso individuo. È stato riportato che la perdita allelica nel cromosoma 18q ha un significato prognostico nello stadio II del carcinoma coloretale. D18S51 e D18S58 si trovano vicini l'uno all'altro sul braccio lungo del cromosoma 18 ed entrambi i marcatori sono utili per acquisire ulteriori informazioni sulla perdita allelica nel cromosoma 18q.

Strumentazione

Il kit è stato ideato per caricare i prodotti di PCR marcati con differenti fluoro fori su un Sequenziatore Automatico Beckman Coulter (CEQ2000XL, CEQ8000, CEQ8800) e sul Sequenziatore Automatico Applied Biosystems.

Limitazioni nell'uso del prodotto

Questo kit è utilizzabile esclusivamente per diagnosi in vitro. Il prodotto non può essere rivenduto alterandone il contenuto senza il consenso scritto da parte dell'azienda. Il prodotto deve essere utilizzato solo da personale specificamente istruito e formato sulle procedure diagnostiche in vitro.

Limitazioni del metodo

L'ottimizzazione della quantità di DNA utilizzato è una variabile critica nell'esecuzione del test AlphaCapillary MSI.
E' pertanto caldamente raccomandata una quantificazione del DNA di partenza.

Sensibilità analitica

Il limite di individuazione analitica (limite di sensibilità) del kit AlphaCapillary MSI è del 5 %.

Controllo di qualità

In accordo con il Sistema di Gestione della Qualità UNI EN ISO 13485:2012 dell'azienda, ogni lotto del kit AlphaCapillary MSI è testato a fronte di specifiche predeterminate in modo da garantire la qualità del prodotto.

Tempistiche del saggio

Estrazione del DNA da campioni freschi, fresco/congelati e paraffinati: 20 minuti al termine del trattamento con proteinasi K; PCR multipla: 180 minuti; Caricamento del prodotto di PCR sull'apparato di elettroforesi capillare: 30 minuti; Analisi dei dati: 30 minuti

Totale: 4 ore e 20 minuti al termine del trattamento con proteinasi K

Nota 1: Il tempo indicato si riferisce al processo di un singolo campione

Nota 2: La tempistica del saggio dipende dal numero di campioni da processare

Nota 3: Il tempo di lavoro del singolo utente è di circa 2 ore al termine del trattamento con proteinasi K.

Alphagenics Biotech

AREA Science Park- Basovizza
Edificio Q1- Statale 14 Km 169,5
34149 Trieste

Tel: +390403755682- Fax: +390403755681

Email: info@alphagenicsbiotech.com

P.I.C.F 01251340327