

Februar 2017

therascreen[®] BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit Handbuch Teil 2: Analyse

Version 1

Zur Identifizierung von Varianten in *BRCA1* und *BRCA2*

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Für den Gebrauch mit der Illumina[®] MiSeqDx[™]-Plattform

CE

REF

875011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2 **MAT**

1103449DE

Inhalt: Teil 2

Verwendungszweck	5
Warnung	5
Testprinzip	6
Zusätzlich benötigtes Material: Analyse	8
Ausrüstung zur Sequenzierung	8
Software zur Sequenzanalyse	8
Von CLC bio empfohlene Systemanforderungen	8
Besondere Anforderungen für das Read-Mapping	9
Besondere Anforderungen für den 3D Molecule Viewer	10
Systemanforderungen	10
Systemempfehlungen	10
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	10
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	11
Verfahren: Teil 2	13
Der Arbeitsablauf im Überblick	13
Protokoll: Datenanalyse	14
Installieren des Analysenarbeitsablaufs	14
Installieren des Analysen-Plug-ins	19
Exportieren der Illumina FASTQ-Dateien vom MiSeq-Instrument	22
Importieren der Illumina FASTQ-Dateien	23
Sequenzanalyse	28

Interpretation der Ergebnisse.....	43
Exportieren einer VCF-Datei.....	44
Fehlerbehebung.....	46
Qualitätskontrolle.....	51
Anwendungseinschränkungen	51
Leistungsmerkmale	53
Messbereich des Tests.....	53
Einheitlichkeit der Amplifikation.....	54
Störsubstanzen	54
Verschleppung	54
Zielalignierte Reads (Testspezifität)	55
Präzision des Tests.....	55
Nachweisgrenze (LOD)	59
Cut-off-Wert des Tests	59
Mindestabdeckung zum Nachweis einer VAF von 5,75 %	60
Richtigkeit.....	61
Limitationen der Varianten	63
Falsch-positive Varianten	63
Falsch-negative Varianten.....	66
Validierung.....	66

Literatur	71
Symbole	74
Bestellinformationen	76

Verwendungszweck

Beim *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit (Hochdurchsatz-Sequenzierung) handelt es sich um einen molekular diagnostischen Test, der zur Identifizierung von Varianten in den codierenden Regionen der humanen Gene *BRCA1* und *BRCA2* vorgesehen ist. Der Test wird an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE) von Ovarialkarzinomproben durchgeführt. Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ist als Hilfsmittel für die Klassifizierung von Ovarialkarzinomen vorgesehen.

Warnung

Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit wurde für die Anwendung mit der Illumina MiSeqDx-Plattform und der Biomedical Genomics Workbench Software (unter Verwendung eines speziellen Analyse-Arbeitsablaufs) validiert.

WICHTIG: Dieses Handbuch ist in zwei Teile unterteilt. Teil 1 enthält eine Zusammenfassung und Beschreibung sowie eine Beschreibung des Testprinzips und nass-chemischen Laborarbeitsablaufs:

- Extraktion der genomischen DNA
- PCR-Amplifikation der Zielsequenz
- Pooling und Aufreinigung der Probe
- Erstellung der Bibliothek
- Aufreinigung der adapterligierten DNA
- Größenselektion
- PCR-Amplifikation der aufgereinigten Bibliothek
- Aufreinigung, Quantifizierung und Pooling der Bibliothek
- Erstellen der gepoolten Bibliothek für die Sequenzierung

-
- Einrichten und Starten des Sequenzierungslaufs
 - Fehlerbehebung

Teil 2 enthält Informationen zur Datenanalyse und zu den Leistungsdaten des Kits:

- Datenanalyse
 - Installieren des Analysenarbeitsablaufs
 - Installieren des Analysen-Plug-ins
 - Exportieren der Illumina FASTQ-Dateien vom MiSeqDx
 - Importieren der Illumina FASTQ-Dateien
 - Sequenzanalyse
- Interpretation der Ergebnisse
- Fehlerbehebung
- Leistungsmerkmale

WICHTIG: Der Arbeitsablauf wurde so ausgelegt und optimiert, dass die in den Teilen 1 und 2 dieses Handbuchs festgelegten Leistungsdaten erhalten werden. Die Anweisungen müssen daher genau befolgt werden. Bei Abweichungen von den Anweisungen in den Teilen 1 und 2 dieses Handbuchs kann QIAGEN nicht verantwortlich gemacht werden. Der gesamte Arbeitsablauf sollte vom Labor des Endbenutzers einer unabhängigen Prüfung unterzogen werden, bevor dieser in den Routinebetrieb integriert wird.

Testprinzip

Die Sequenzierung wird nach dem Protokoll des Illumina-Herstellers durchgeführt. Die FASTQ-Dateien werden mit der Biomedical Genomics Cancer Research Workbench Software nach dem Arbeitsablauf BRCA1/2 CE-IVD verarbeitet. Zur Identifizierung der Varianten wird für jede Probe eine Formatdatei erstellt, und für die Interpretation der Varianten wird die Verwendung der Biomedical Genomics Cancer Workbench Software empfohlen.

Zur Gewährleistung qualitativ hochwertiger Ergebnisse werden in verschiedenen Schritten des Präparations- und Sequenzierungslaufs der Bibliothek Inprozesskontroll-Kriterien angewendet (siehe Abbildung 7). Diese Kriterien ermöglichen die Validierung der verschiedenen Schritte des Arbeitsablaufs, um Proben zu identifizieren, die unzureichende Sequenzierungsergebnisse liefern oder um potenzielle Kontaminationen zu erkennen.

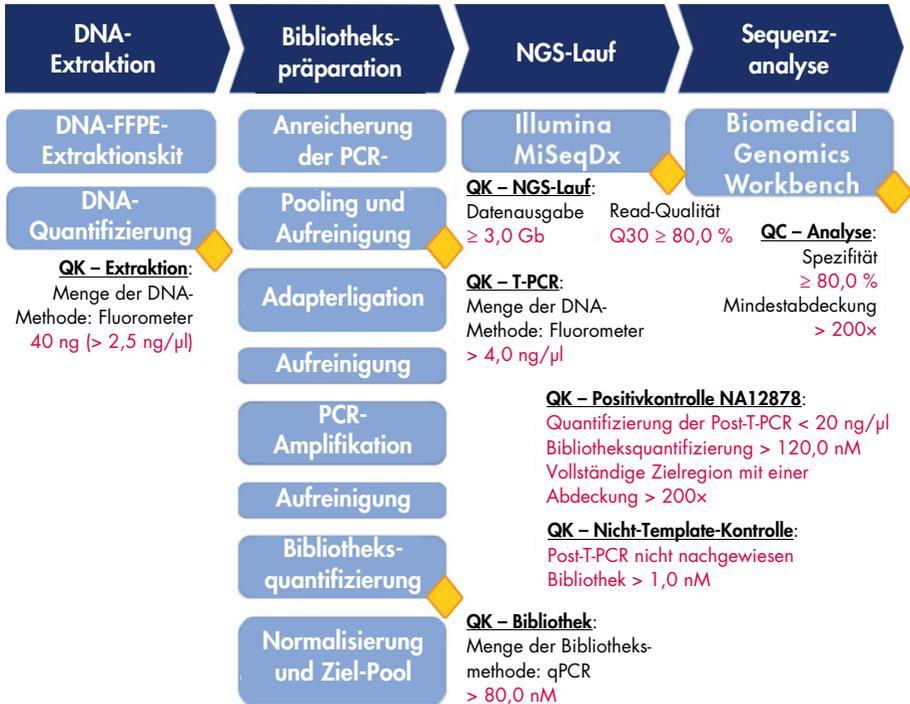


Abbildung 7. Kriterien für die Inprozesskontrolle. Im Rahmen der Sequenzierung (blaue Kästchen) werden verschiedene Inprozesskontrollen durchgeführt (gelbe Rauten), um die T-PCR, die Bibliothekspräparation und den Sequenzierungslauf zu validieren. Als abschließendes Kriterium zur Gewährleistung einer zuverlässigen Identifizierung einer Variante an einer bestimmten Position wird die Mindestabdeckung verwendet. Die Spezifität beschreibt den Prozentsatz von gepaarten Reads, die mit der Zielregion aligniert werden können.

Zusätzlich benötigtes Material: Analyse

Stellen Sie sicher, dass die in diesem Verfahren verwendeten Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Ausrüstung zur Sequenzierung

- Illumina MiSeqDx (Illumina, Inc.; Kat.-Nr. DX-410-1001)
- Illumina MiSeq Software, Version 2.5.0.5 oder höher
- Illumina Experiment Manager Software, Version 1.9 oder höher

Software zur Sequenzanalyse

- Biomedical Genomics Workbench, Version 2.1.1 von CLC bio (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 mit Biomedical Genomics Extension von CLC bio
- QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plug-in
Kann auf der QIAGEN-Website von der Registerkarte **Product Resources** der *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit Produktseite heruntergeladen werden.
- Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD
Kann auf der QIAGEN-Website von der Registerkarte **Product Resources** der *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit Produktseite heruntergeladen werden.

Von CLC bio empfohlene Systemanforderungen

(www.clcbio.com/support/system-requirements)

- Windows Vista®, Windows® 7, Windows 8, Windows 10, Windows Server 2008 oder Windows Server 2012
Mac OS® 10.7 oder höher
Linux: Red Hat® 5.0 oder höher, SUSE® 10.2 oder höher, Fedora® 6 oder höher
- Mindestens 8 GB RAM, 16 GB RAM empfohlen

- Mindestens Display mit 1024 x 768, Display mit 1600 x 1200 empfohlen
- Prozessor von Intel® oder AMD®
- Mindestens 100 GB freier Speicherplatz im benutzerdefinierten Verzeichnis des Standardbetriebssystems
- Mindestens 90 GB freier Speicherplatz im Verzeichnis CLC_References (wenn Sie nicht mit einem Server verbunden sind)

Wenn weniger freier Speicherplatz verfügbar ist, kann der Speicherort der Referenzdaten auch geändert werden (siehe resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbenchapplication/current/). Erweitern Sie den Bereich **Getting started** (Erste Schritte), öffnen Sie **Reference data** (Referenzdaten) und klicken Sie auf **Download and configure reference data** (Referenzdaten herunterladen und konfigurieren).

Besondere Anforderungen für das Read-Mapping

Die im Folgenden angegebenen Nummern stellen die Mindestanforderung und die empfohlene Anforderung für den Speicher des Systems dar, auf dem das Mapping und die Analyse durchgeführt werden sollen. Die Anforderungen beruhen auf der Genomgröße.

- Mensch (3,2 GB) und Maus (2,7 GB)
 - Mindestens: 6 GB RAM, empfohlen: 8 GB RAM

Für Systeme mit weniger Speicher wird empfohlen, das alte Read Mapper Plug-in zu installieren (siehe www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version). Dieses Plug-in ist zwar langsamer als der Standard-Mapper, aber besser für den verfügbaren Speicher geeignet.

Besondere Anforderungen für den 3D Molecule Viewer

Systemanforderungen

- Eine Grafikkarte, die OpenGL® 2.0 unterstützt
- Aktualisierte Grafiktreiber

Stellen Sie sicher, dass der aktualisierte Treiber für die Grafikkarte installiert ist.

Systemempfehlungen

- Eine eigenständige Grafikkarte von NVIDIA® oder AMD/ATI™

Es können auch moderne integrierte Grafikkarten verwendet werden (z. B. aus der Intel HD Graphics Serie), diese sind jedoch normalerweise langsamer als eigenständige Karten.

- Zum Arbeiten mit großen Komplexen wird eine 64-Bit-Workbench-Version empfohlen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Die Durchführung von NGS-Tests setzt eine gute Laborpraxis voraus. Dazu gehört die Wartung und Kalibrierung aller verwendeten Geräte und die Einhaltung aller geltenden Vorschriften und relevanten Standards.

- Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die im *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit enthaltenen Reagenzien liegen in einer optimalen Verdünnung vor. Die Reagenzien dürfen nicht weiter verdünnt werden, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Alle im *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus demselben Kit vorgesehen. Tauschen Sie keine Reagenzien zwischen verschiedenen *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits aus, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Es dürfen keine Komponenten aus dem *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit und den anderen erforderlichen, aber nicht im Lieferumfang enthaltenen Kits verwendet werden, die abgelaufen sind oder nicht fachgerecht transportiert oder aufbewahrt wurden. Überprüfen Sie dies stets vor dem Gebrauch.
- Die Veränderung der Inkubationszeiten und/oder -temperaturen kann zu falschen oder widersprüchlichen Ergebnissen führen.
- Ergreifen Sie alle Vorsichtsmaßnahmen, um sicherzustellen, dass die Proben korrekt analysiert werden. Achten Sie diesbezüglich besonders auf Fehler beim Einsetzen der Proben, Beladungsfehler, Pipettierfehler und Fehler beim Einlesen der Barcodes.
- Achten Sie darauf, dass die Proben auf systematische Weise behandelt werden, um zur Gewährleistung der Rückverfolgbarkeit jederzeit eine korrekte Identifizierung zu ermöglichen.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination durch die Verschleppung von PCR-Produkten zu verhindern, die zu einem falsch-positiven Signal führen kann.

-
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination mit DNase zu vermeiden, die zu einer Zersetzung der DNA-Templates führen kann.
 - Verwenden Sie nukleasefreie Laborgeräte (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße). Verwenden Sie für alle Pipettierschritte frische, aerosolbeständige Pipettenspitzen, um eine Kreuzkontamination von Proben und Reagenzien zu verhindern.
 - Setzen Sie den Prä-PCR-Master-Mix mit speziellen Materialien (Pipetten, Spitzen usw.) in einem speziellen Bereich an, an dem keine DNA-Matrizen (cDNA, Plasmid oder PCR-Produkte) gehandhabt werden. Führen Sie die Zugabe von Template in einer gesonderten Zone (vorzugsweise in einem separaten Raum) mit speziellen Materialien (Pipetten, Spitzen usw.) durch.
 - Weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren finden Sie im Benutzerhandbuch des Illumina MiSeqDx Instruments. Die NGS-Plattform muss korrekt installiert werden, um eine einwandfreie Stromversorgung zu gewährleisten und sicherzustellen, dass nach dem Start keine Eingriffe durch den Benutzer mehr erforderlich sind.
 - Das Illumina MiSeqDx Instrument darf erst geöffnet werden, wenn der Testlauf abgeschlossen ist.

Verfahren: Teil 2

Der Arbeitsablauf im Überblick

Einige Schritte des in der folgenden schematischen Abbildung beschriebenen Arbeitsablaufs wurden für dieses Verfahren optimiert. Dies schließt auch Schritte ein, für die Kits und Reagenzien benötigt werden, die nicht im Lieferumfang enthalten sind.



Lesen Sie aufmerksam die folgenden Angaben und richten Sie sich nur nach den Anweisungen in Teil 1 und Teil 2 dieses Handbuchs.

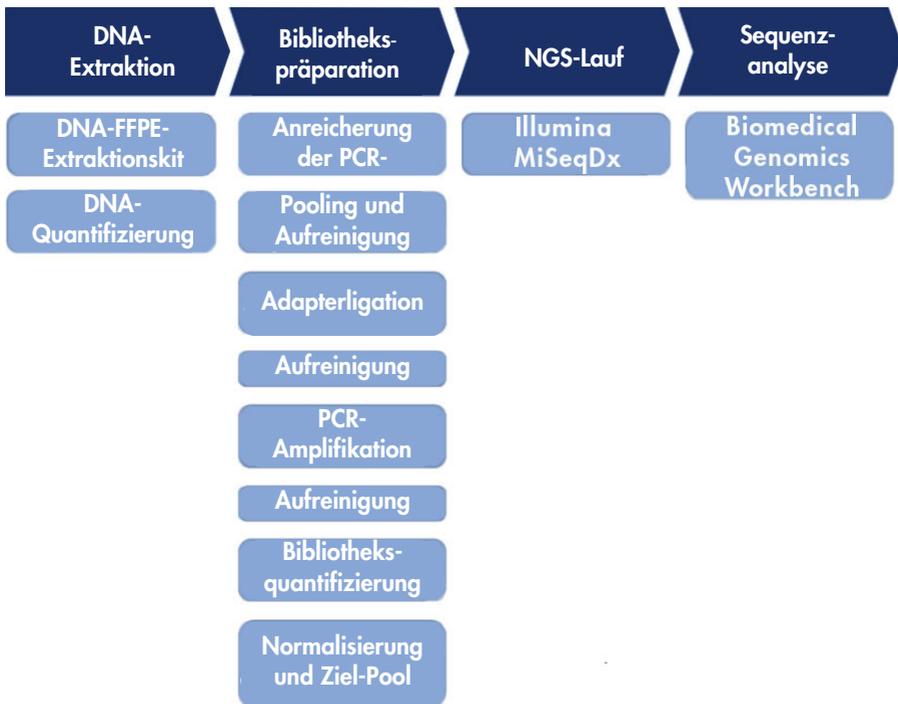


Abbildung 8. Der NGS-Arbeitsablauf im Überblick

Protokoll: Datenanalyse

In diesem Abschnitt ist die Softwareinstallation und die Analyse der FASTQ-Dateien beschrieben, die bei der Sequenzierung erstellt werden.

Produkte und Software, die für die Datenanalyse benötigt werden:

- Biomedical Genomics Workbench Software, Version 2.1.1 (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 mit Biomedical Genomics Extension (www.clcbio.com)
- FASTQ-Dateien (für gepaarte Reads sind zwei FASTQ-Dateien pro Probe zu erwarten)

Es ist wichtig, dass für die Sequenzanalyse der Analysenarbeitsablauf des jeweiligen Tests verwendet wird. Es wird vorausgesetzt, dass der Benutzer die CLC-Softwareanalysen mit einem Nicht-Administrator-Benutzerkonto durchführt.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Wenn nicht bereits installiert, muss vor der Sequenzanalyse der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD für die Testanalyse installiert werden. Eine herunterladbare Version ist auf der QIAGEN-Website auf der Registerkarte **Product Resources** der *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit Produktseite verfügbar.
- Wenn nicht bereits installiert, muss vor der Sequenzanalyse das QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plug-in installiert werden.

Installieren des Analysenarbeitsablaufs

Es gibt zwei Optionen zum Installieren des Analysenarbeitsablaufs:

- Lokale Installation: Führen Sie den folgenden Arbeitsablauf aus: „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation).
- Installation auf dem CLC Genomics Server: Überspringen Sie den Arbeitsablauf „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation) und führen

Sie den Arbeitsablauf „Workflow: server installation process“ (Arbeitsablauf: Serverinstallation) aus.

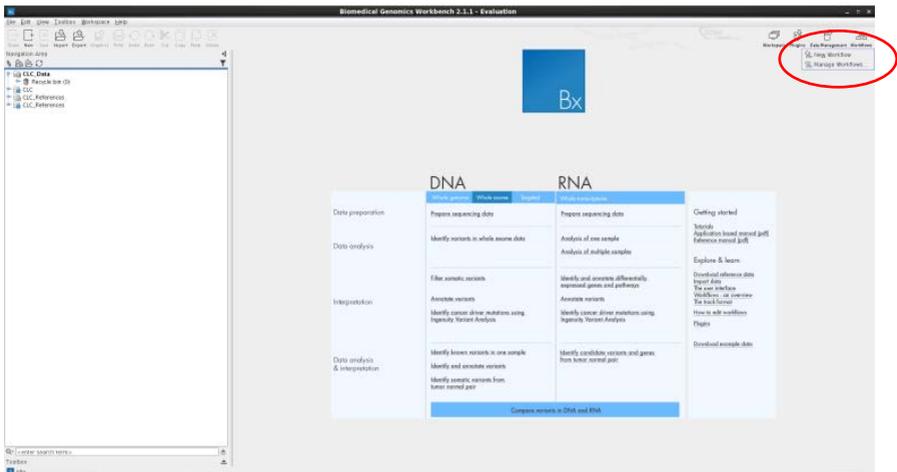
Wenn der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD bereits installiert ist, überspringen Sie die Arbeitsabläufe „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation) und „Workflow: server installation process“ (Arbeitsablauf: Serverinstallation).

Arbeitsablauf: lokale Installation

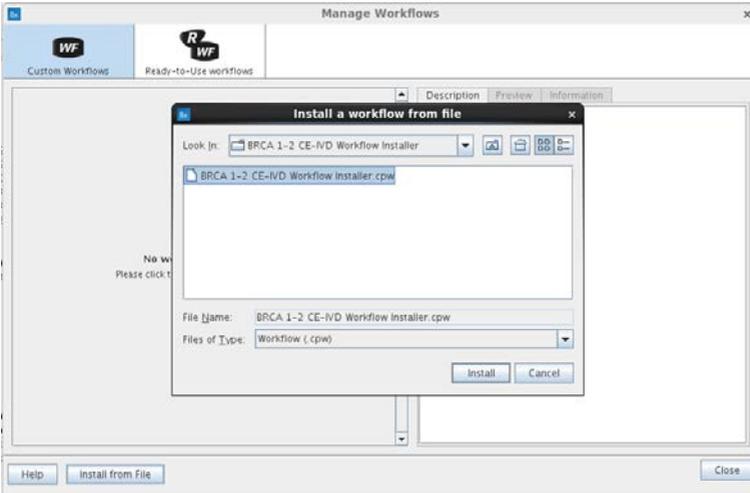
Über den Arbeitsablauf „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation) wird auf dem lokalen Computer, auf dem die Biomedical Genomics Workbench Software installiert ist, der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD installiert.

Verfahren

1. Starten Sie die **Biomedical Genomics Workbench** Software.
2. Klicken Sie auf **Workflows** (Arbeitsabläufe) und dann auf **Manage Workflows** (Arbeitsabläufe verwalten).

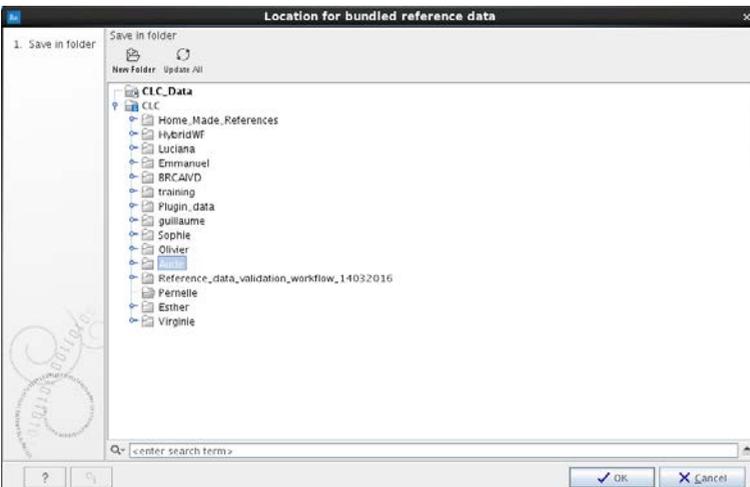


3. Klicken Sie auf **Install from File** (Von Datei installieren).

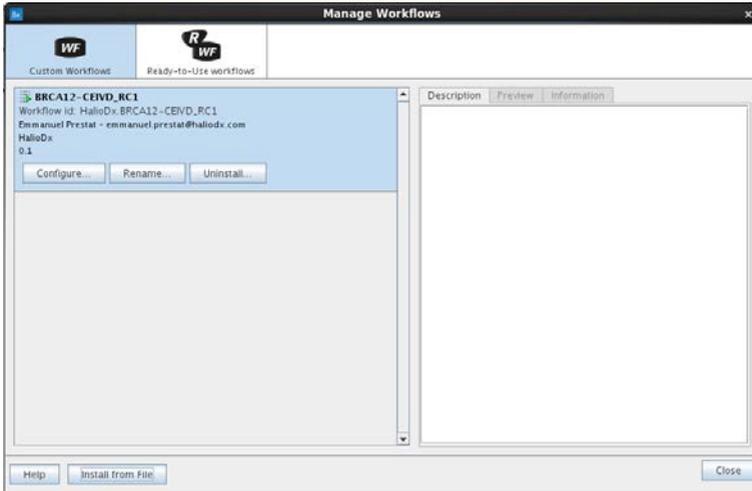


4. Wählen Sie die Arbeitsablaufdatei **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw** aus. Klicken Sie auf **Install** (Installieren).

5. Erstellen Sie einen neuen Ordner und wählen Sie diesen aus. Klicken Sie dann auf **OK**.



6. Klicken Sie auf **Close** (Schließen).



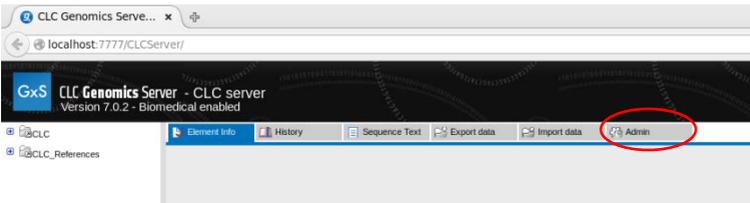
Arbeitsablauf: Serverinstallation

Über den Arbeitsablauf „Workflow: server installation process“ (Arbeitsablauf: Serverinstallation) wird auf dem CLC Genomics Server (Biomedical) der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD installiert. Im folgenden Verfahren wird für die IP-Adresse des Servers „serverIP“ verwendet und es wird vorausgesetzt, dass der Port des CLC Genomics Servers „7777“ lautet (Standardeinstellung).

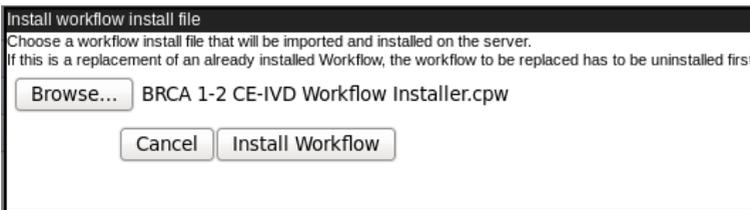
Verfahren

1. Stellen Sie in einem Webbrowser eine Verbindung zu **http://serverIP:7777/** her.
Ersetzen Sie „serverIP“ durch die IP-Adresse des Servers oder verwenden Sie „localhost“, wenn der Webbrowser direkt vom Server ausgeführt wird.
2. Geben Sie die Anmeldedaten für CLC-Administratoren ein. Der Benutzername lautet standardmäßig „root“ und das Kennwort „default“.

3. Klicken Sie auf die Registerkarte **Admin** (Verwaltung).



4. Öffnen Sie **Workflows** (Arbeitsabläufe) und klicken Sie auf **Install Workflow** (Arbeitsablauf installieren).



5. Wählen Sie die Arbeitsablaufdatei **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw** aus und klicken Sie auf **Install Workflow** (Arbeitsablauf installieren).

Hinweis: Nach der Installation des Arbeitsablaufs BRCA 1/2 CE-IVD muss die Biomedical Genomics Workbench Software neu gestartet werden, bevor die FASTQ-Dateien vom MiSeq-Instrument importiert werden können.

Installieren des Analysen-Plug-ins

Es gibt zwei Optionen zum Installieren des Analysen-Plug-ins:

- Lokale Installation: Führen Sie das folgende Verfahren aus: „Plug-in: local installation process“ (Plug-in: lokale Installation).
- Installation auf dem CLC Genomics Server: Überspringen Sie das Verfahren „Plug-in: local installation process“ (Plug-in: lokale Installation) und führen Sie das Verfahren „Plug-in: server installation process“ (Plug-in: Serverinstallation) aus.

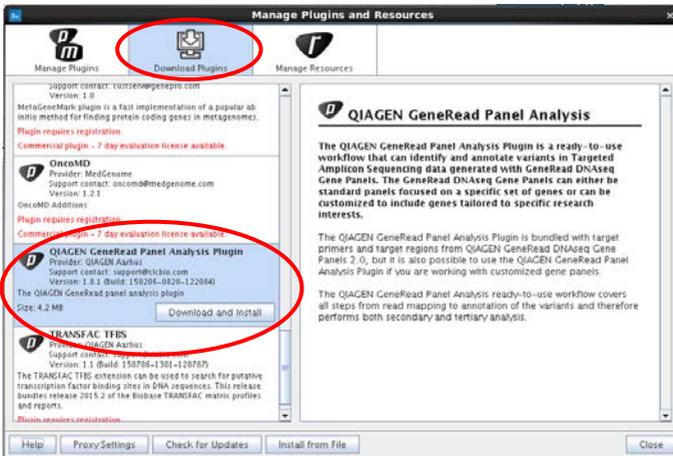
Wenn das Analysen-Plug-in bereits installiert ist, überspringen Sie die Verfahren „Plug-in: local installation process“ (Plug-in: lokale Installation) und „Plug-in: server installation process“ (Plug-in: Serverinstallation).

Plug-in: lokale Installation

Mit diesem Verfahren wird das QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plug-in auf dem lokalen Computer installiert, auf dem die CLC Biomedical Genomics Workbench Software bereits installiert ist.

Verfahren

1. Starten Sie die Biomedical Genomics Workbench Software.
2. Klicken Sie auf **Plugins** (Plug-ins) und wählen Sie dann **Download Plugins** (Plug-ins herunterladen) aus.



3. Wählen Sie das QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plug-in aus und klicken Sie dann auf **Download and Install** (Herunterladen und installieren).

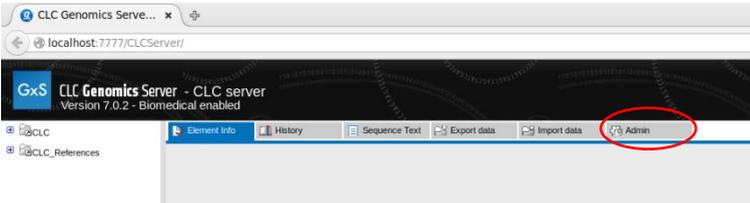
Plug-in: Serverinstallation

Mit diesem Verfahren wird auf dem CLC Genomics Server (Biomedical) das QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plug-in installiert. Im folgenden Verfahren wird für die IP-Adresse des Servers „serverIP“ verwendet und es wird vorausgesetzt, dass der Port des CLC Genomics Servers „7777“ lautet (Standardeinstellung).

Verfahren

1. Stellen Sie in einem Webbrowser eine Verbindung zu **http://serverIP:7777/** her.
Ersetzen Sie „serverIP“ durch die IP-Adresse des Servers oder verwenden Sie „localhost“, wenn der Webbrowser direkt vom Server ausgeführt wird.

2. Geben Sie die Anmeldedaten für CLC-Administratoren ein. Der Benutzername lautet standardmäßig „root“ und das Kennwort „default“.
3. Klicken Sie auf die Registerkarte **Admin** (Verwaltung).



4. Öffnen Sie **Plugins** (Plug-ins).



5. Gehen Sie zum Panel **Install new plugin** (Neues Plug-in installieren) und öffnen Sie mithilfe des Befehls **Browse...** (Durchsuchen...) den Speicherort der Datei.



Eine herunterladbare Version des GeneRead Panel Analysis Server Plug-ins ist auf der QIAGEN-Website auf der Registerkarte **Product Resources** der *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit Produktseite verfügbar.

Exportieren der Illumina FASTQ-Dateien vom MiSeq-Instrument

Die auf dem MiSeq-Computer gespeicherten FASTQ-Dateien müssen vom MiSeq-Instrument zum gewünschten Zielspeicherort (externes Laufwerk oder Server) exportiert werden, damit sie für die Biomedical Genomics Workbench Software verfügbar sind.

Hinweis: Die FASTQ-Dateien befinden sich im folgenden Sequenzierungslaufordner:
MiSeqAnalysis\RunID\Data\Intensities\BaseCalls.

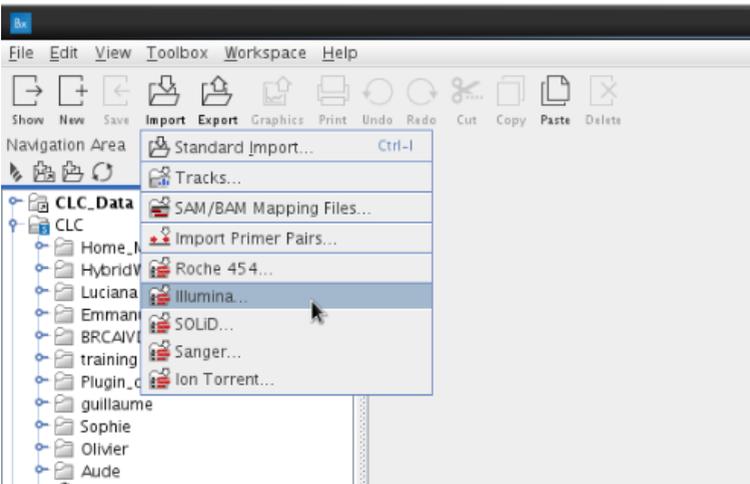
Wir empfehlen, die Ergebnisdatei nicht langfristig auf der NGS-Plattform zu speichern, um Verwechslungen zwischen den verschiedenen Läufen zu vermeiden und sicherzustellen, dass ausreichend Speicherkapazität verfügbar ist.

Importieren der Illumina FASTQ-Dateien

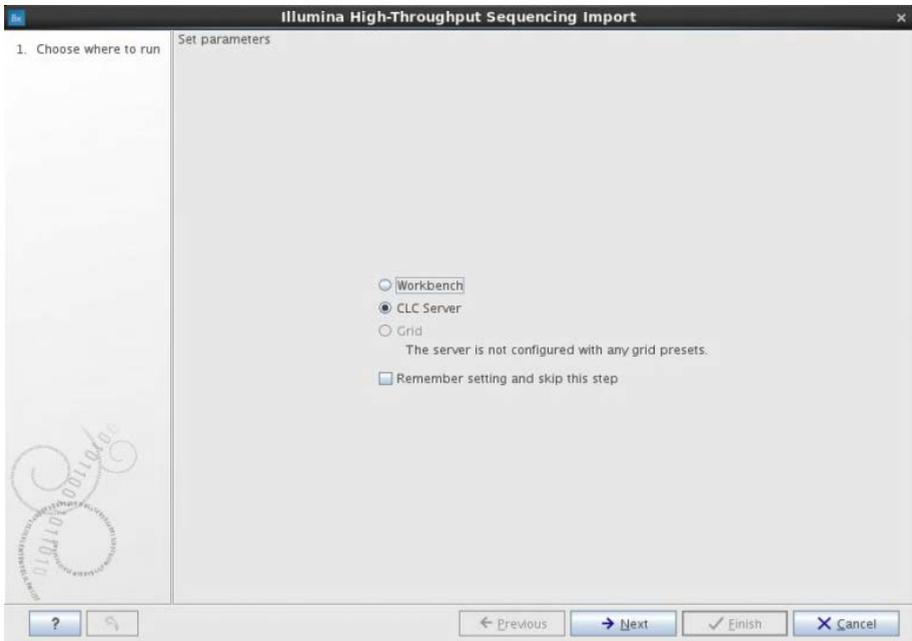
Es gibt zwei Illumina FASTQ-Dateien pro Probe.

Verfahren

1. Öffnen Sie die Biomedical Genomics Workbench Software.
2. Klicken Sie auf **Import** (Importieren) und wählen Sie im Menü **Illumina** aus.

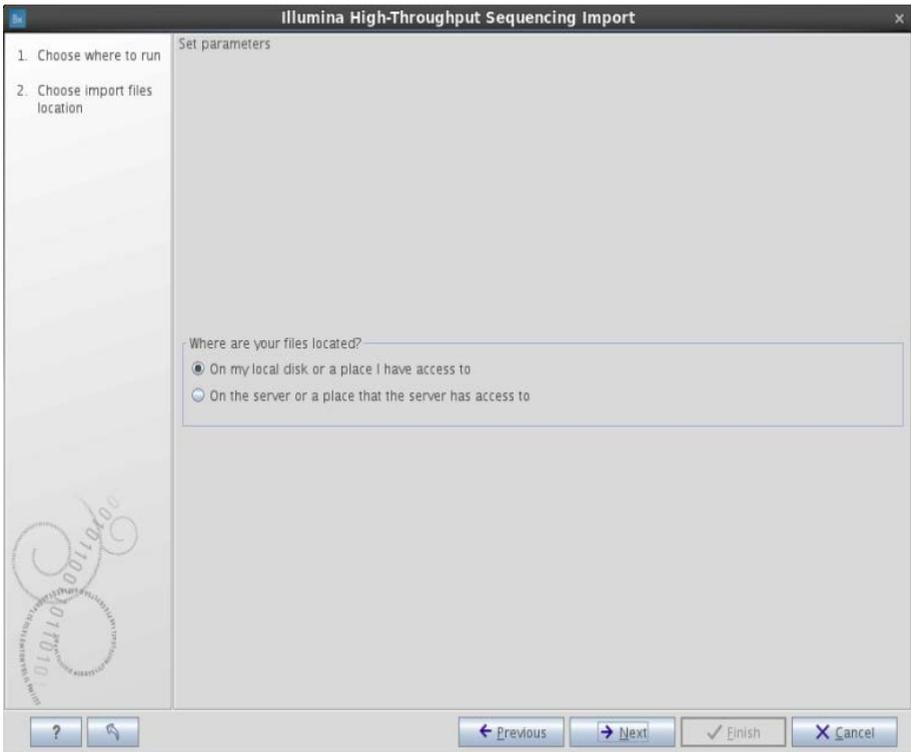


3. Legen Sie fest, wo die Dateien ausgeführt werden sollen, indem Sie die gewünschte Option auswählen.
 - Wählen Sie **Workbench** aus, wenn der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD lokal installiert ist, d. h. die Installation wurde mit „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation) durchgeführt.
 - Wählen Sie **CLC Server** aus, wenn der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD auf dem Server installiert ist, d. h. die Installation wurde mit „Workflow: server installation process“ (Arbeitsablauf: Serverinstallation) durchgeführt.



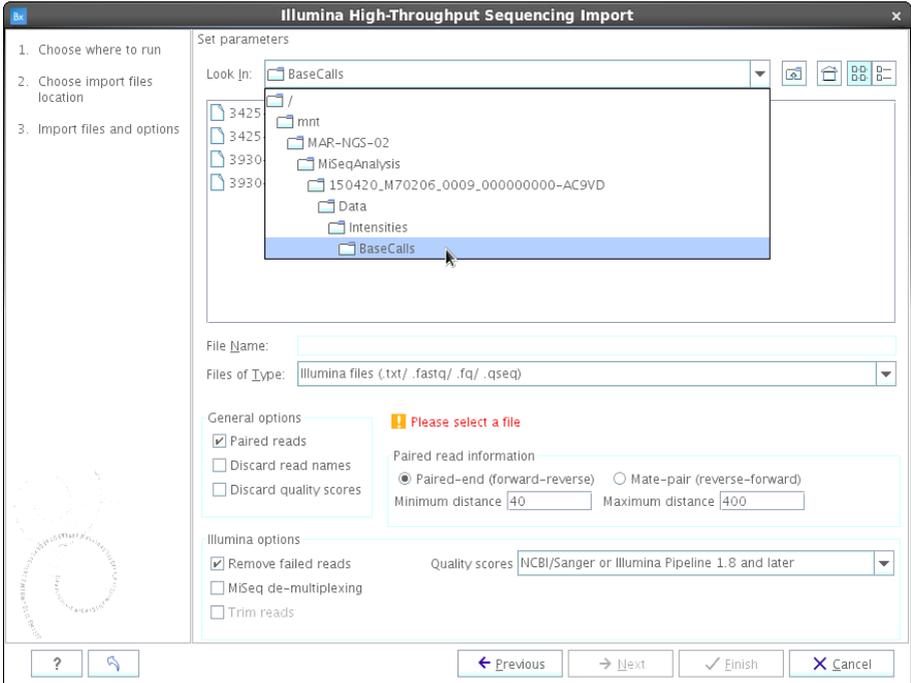
4. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).

5. Wenn im vorherigen Schritt die Option **CLC Server** ausgewählt wurde, wird das folgende Fenster geöffnet.



6. Wählen Sie **On my local disk or a place I have access to** (Auf meiner lokalen Festplatte oder an einem Ort, auf den ich Zugriff habe) aus und klicken Sie auf **Next** (Weiter).

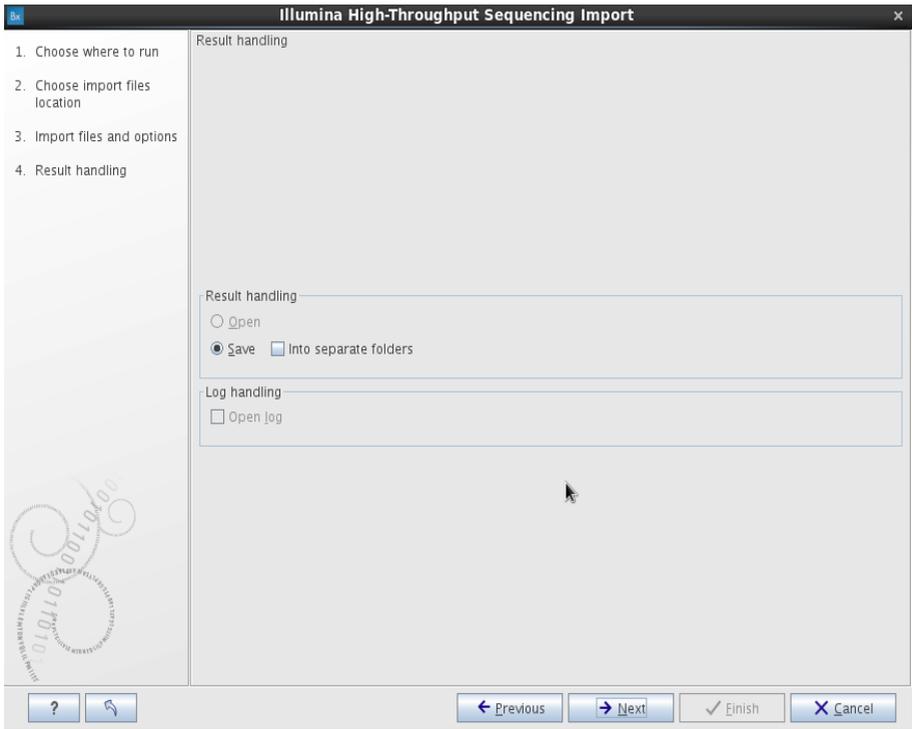
7. Wählen Sie vom folgenden Pfad in der MiSeq-Datei alle FASTQ-Dateien aus, die analysiert werden sollen: **Analysis/Data/Intensities/BaseCalls**.



8. Wählen Sie die folgenden Einstellungen aus:

- Aktivieren Sie die Option **Paired reads** (Gepaarte Reads).
 - Wählen Sie die Option **Paired-end (forward-reverse)** (Gepaarte Enden vorwärts-rückwärts) aus.
 - Geben Sie in das Feld **Minimum distance** (Mindestabstand) den Wert **40** und in das Feld **Maximum distance** (Höchstabstand) den Wert **400** ein.
 - Aktivieren Sie die Option **Remove failed reads** (Fehlgeschlagene Reads entfernen).
9. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).

10. Das folgende Fenster wird geöffnet. Wählen Sie **Save** (Speichern) aus und klicken Sie auf **Next** (Weiter).



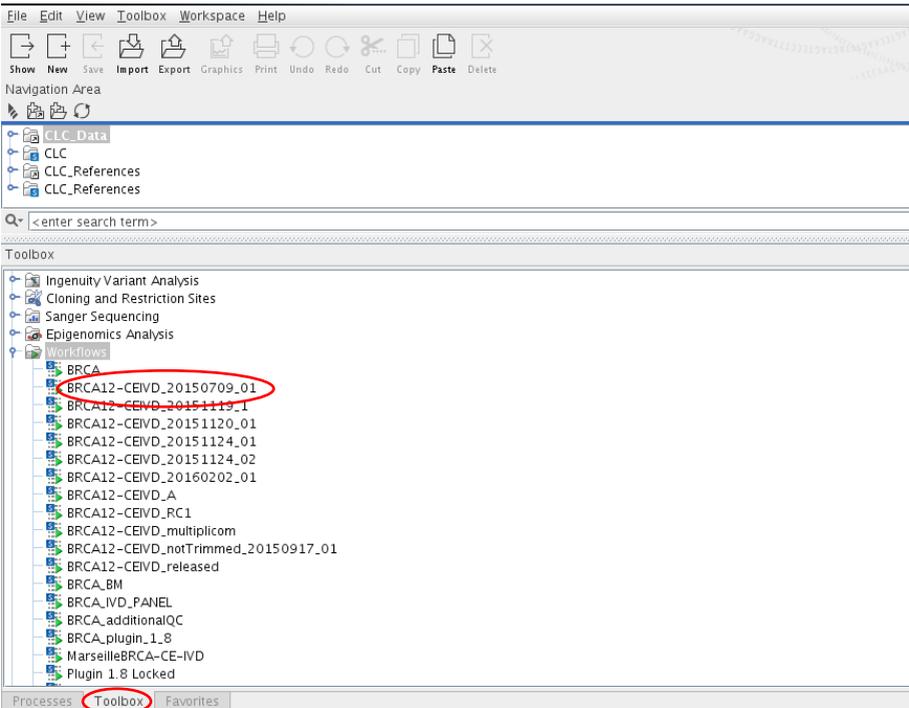
11. Erstellen Sie einen Ordner zum Speichern der geparteten FASTQ-Dateien und klicken Sie auf **Finish** (Fertigstellen).

Sequenzanalyse

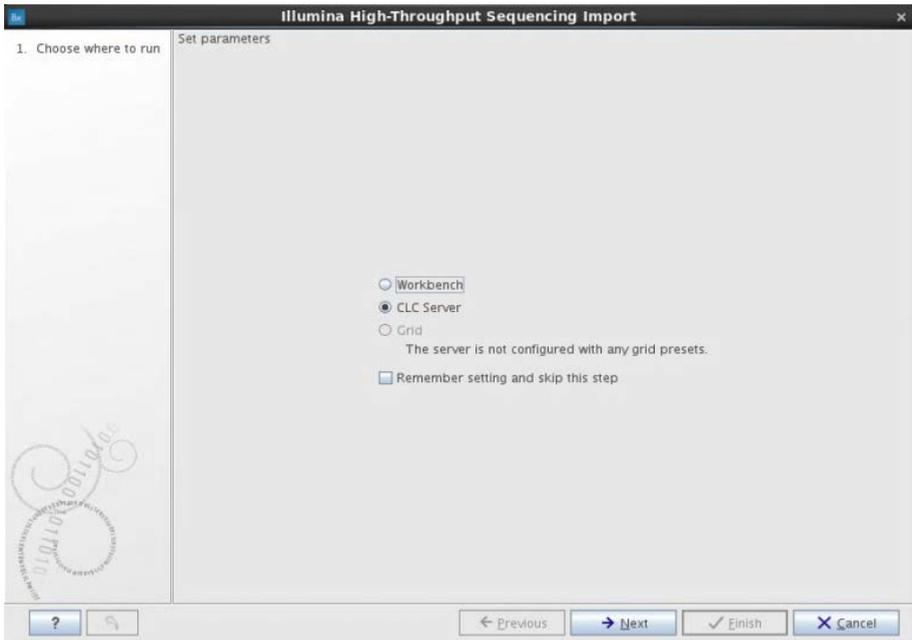
Verarbeiten Sie die FASTQ-Dateien mit dem Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD, der mithilfe des Arbeitsablaufs „Workflow: local installation process“ (Arbeitsablauf: lokale Installation) oder „Workflow: server installation process“ (Arbeitsablauf: Serverinstallation) installiert wurde. Befolgen Sie die unten beschriebenen Anweisungen für die gepaarte FASTQ-Analyse.

Verfahren

1. Wählen Sie die Registerkarte **Toolbox** (Werkzeuge) aus und doppelklicken Sie auf den Arbeitsablauf.



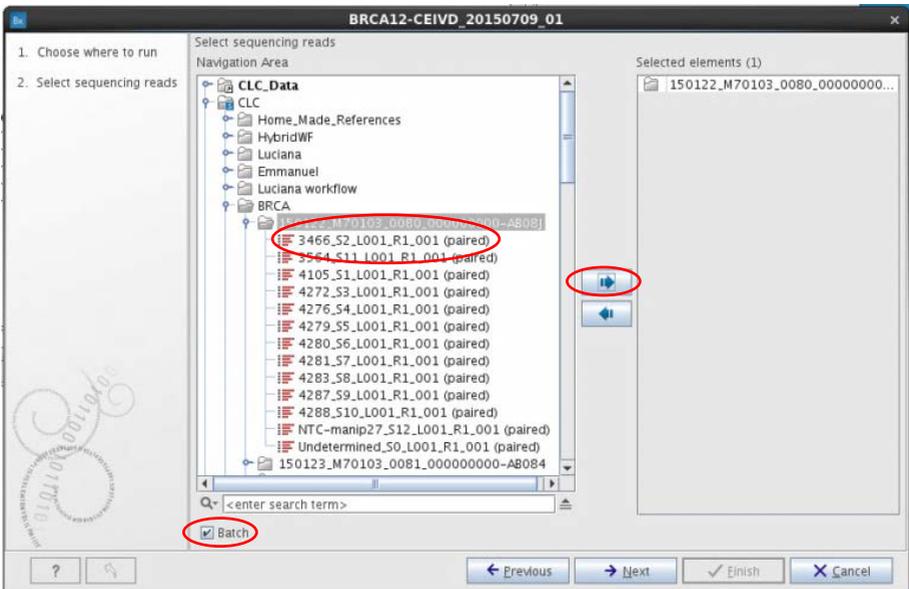
Das folgende Fenster wird geöffnet.



2. Wählen Sie die gewünschte Option aus:

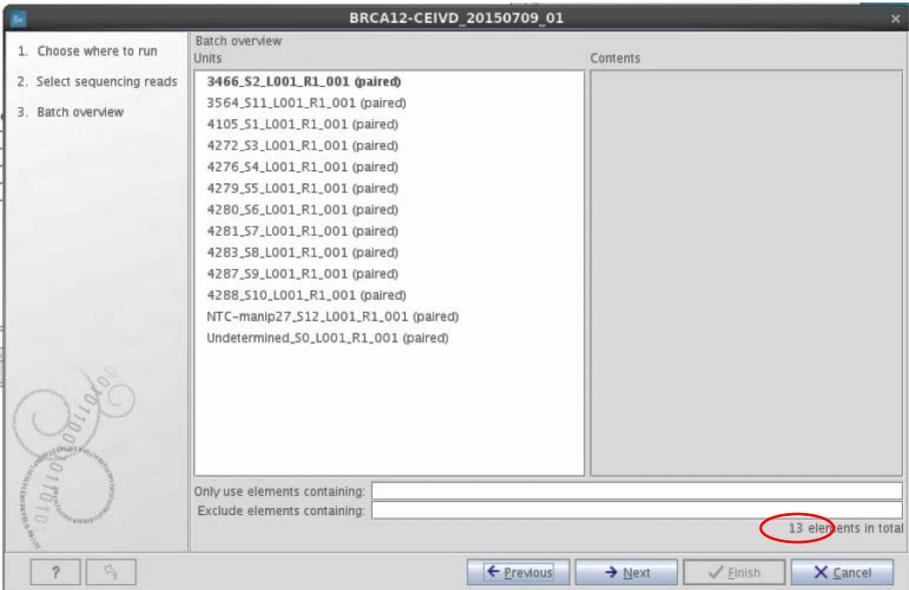
- Wählen Sie **Workbench** aus, wenn der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD lokal installiert ist.
- Wählen Sie **CLC Server** aus, wenn der Arbeitsablauf BRCA 1/2 CE-IVD auf dem Server installiert ist.

3. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



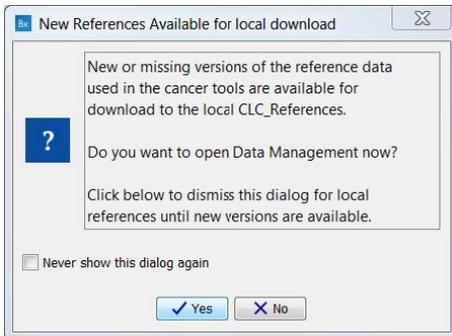
4. Wählen Sie den Ordner mit den FASTQ-Dateien aus, aktivieren Sie die Option **Batch** und klicken Sie auf den blauen Pfeil , um den Ordner auszuwählen.
5. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).

6. Stellen Sie sicher, dass im Panel **Units** (Einheiten) 13 Elemente ausgewählt sind. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



Hinweis: Beim ersten Gebrauch des Arbeitsablaufs BRCA 1/2 CE-IVD müssen die Referenzdaten im Ordner **CLC_References** ausgewählt werden.

Beim ersten Öffnen der Biomedical Genomics Workbench Software werden Sie in einem Dialogfeld darüber informiert, dass die Referenzdaten für das Download in das lokale oder serverbasierte **CLC_References**-Repository verfügbar sind.

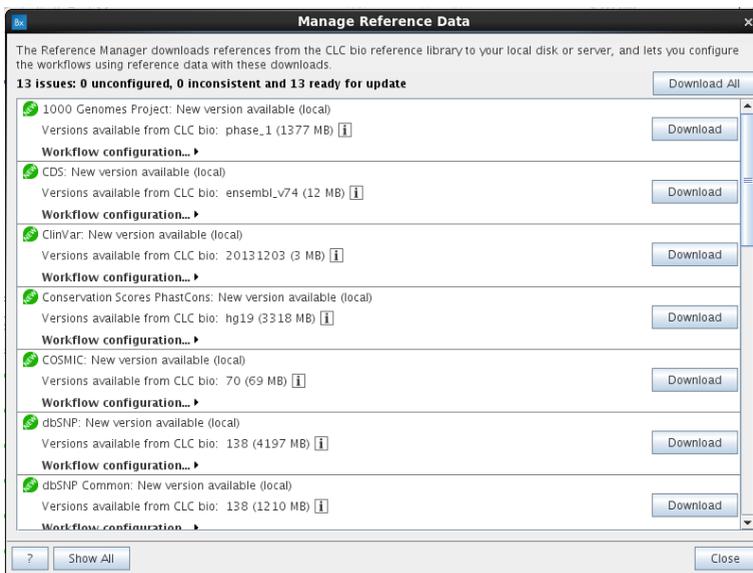


Klicken Sie auf **Yes** (Ja). Der Assistent **Manage Reference Data** (Referenzdaten verwalten) wird geöffnet.

Dieser Assistent kann auch dadurch aufgerufen werden, dass Sie oben rechts in der Biomedical Genomics Workbench Software auf **Data Management** (Datenverwaltung) klicken.



Klicken Sie zum Installieren der Referenzdaten auf **Data Management** (Datenverwaltung) und laden Sie die folgenden Referenzdatenbanken herunter: 1000 Genomes Project, CDS, ClinVar, Conservation Scores PhastCons, Cosmic, dbSNP, dbSNP Common, Genes, HapMap, mRNA, Sequence, Target Primers, Target Regions.



Weitere Informationen hierzu finden Sie im *Biomedical Genomics Workbench Application Manual* (Anwendungshandbuch für die Biomedical Genomics Workbench) in Abschnitt 4.1, „Reference data“ (Referenzdaten).

Wählen Sie die Referenzdaten in **CLC_References** aus, um die unten stehenden Schritte 7–22 durchzuführen.

In Schritt 7 muss z. B. im folgenden Pfad die Arbeitsablaufeingabe für CDS ausgewählt werden:

CLC_References/homo_sapiens/cds/ensemble_V74/Homo_sapiens_ensembl_v74_CDS

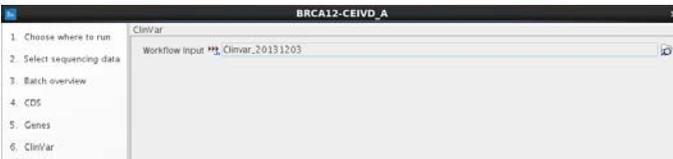
Hinweis: Nach dem ersten Gebrauch muss in den folgenden 16 Schritten (7–22) nur durch die Bildschirme geklickt werden, indem Sie unten auf dem Bildschirm auf **Next** (Weiter) klicken.



7. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



8. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



9. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



10. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



11. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



12. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



13. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



14. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



15. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



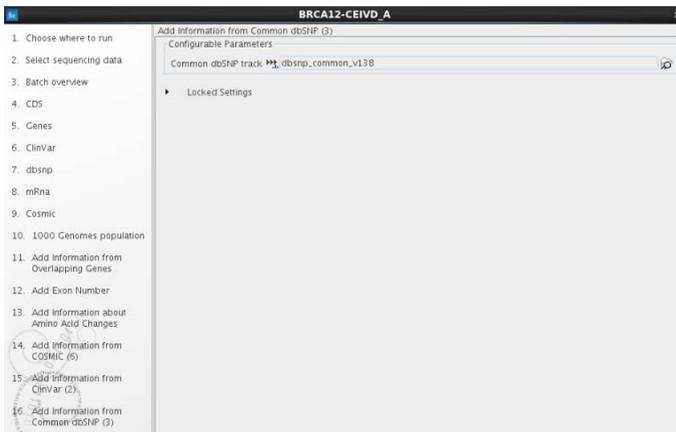
16. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



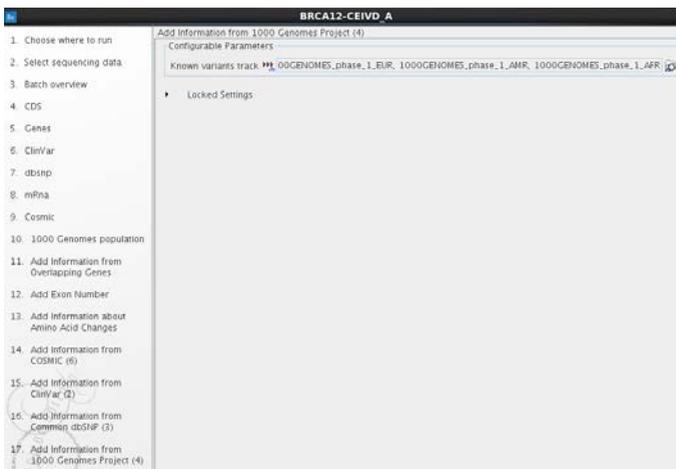
17. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



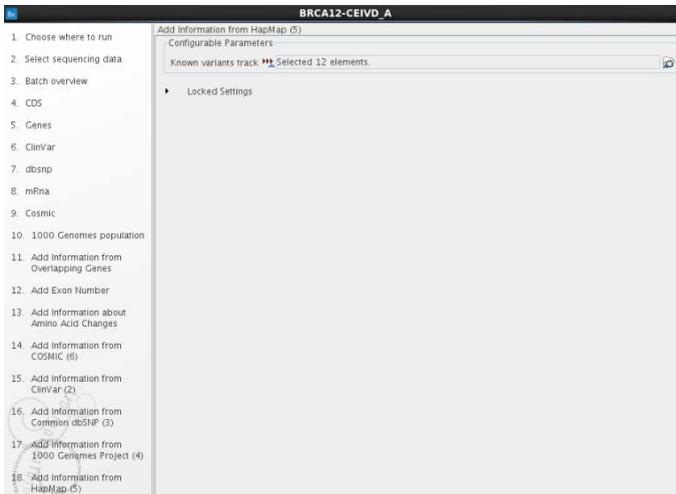
18. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



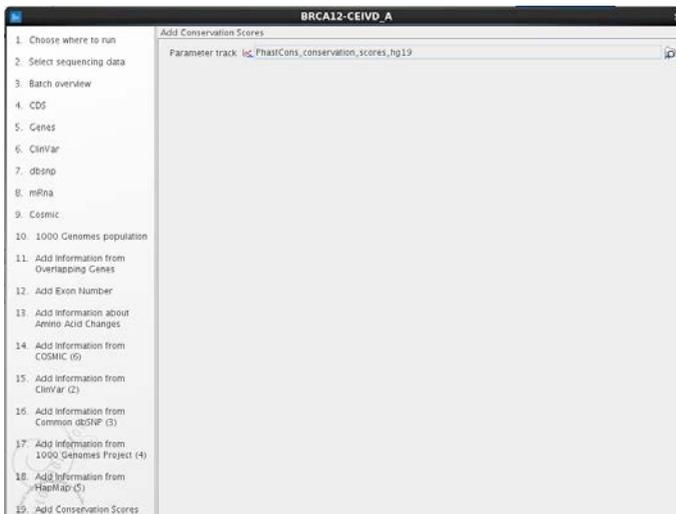
19. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



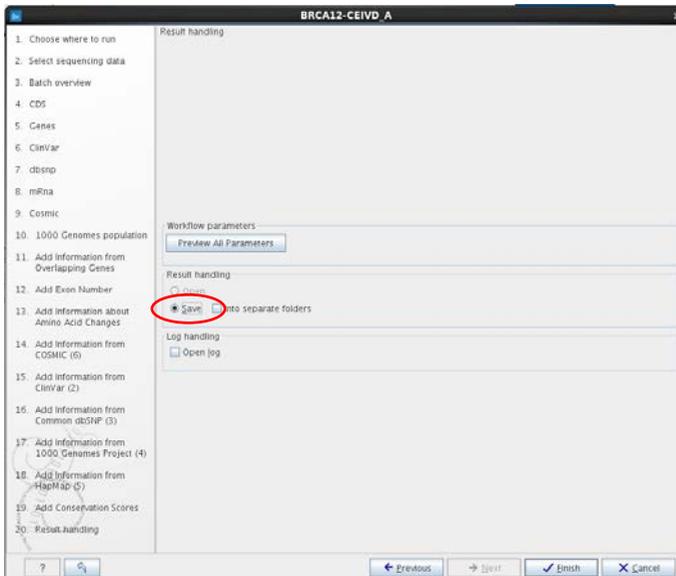
20. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



21. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



22. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



23. Wählen Sie **Save** (Speichern) aus und klicken Sie dann auf **Finish** (Fertigstellen). Die Sequenzanalyse wird gestartet.

Gehen Sie nach Abschluss der Sequenzanalyse und vor dem Fortfahren mit der Variantenanalyse wie folgt vor:

- Stellen Sie sicher, dass die Mindestanzahl der Reads pro Amplifikat für die Positivkontrolle > 200x ist.
Dies zeigt an, dass die Homogenität der *BRCA1/BRCA2*-Amplifikate groß genug ist.
- Stellen Sie sicher, dass die Mindestanzahl der Reads pro Amplifikat für die Proben > 200x ist.

WICHTIG: Wir empfehlen, für die endgültige Analyse nur Ziele mit einer Abdeckung > 200 Reads zu verwenden. Die Mindestabdeckung pro Amplifikat ist im Bericht „Locally realigned trimmed reads read mapping (coverage) region statistics“ aufgeführt.

Die Read-Spezifität gibt den Prozentsatz der Reads an, die mit der Zielregion aligniert sind. Um die Spezifität der Sequenzierung zu berechnen und sicherzustellen, dass diese

ausreichend ist, öffnen Sie den Bericht „Mapping summary report“ (Mapping-Übersicht) (siehe Tabelle 7) und suchen Sie nach der Gesamtanzahl der Reads. Öffnen Sie dann den Bericht „Coverage summary report“ (Abdeckungsübersicht). Die Daten der Reads, die mit der Zielregion aligniert sind, werden im „Coverage summary report“ (Abdeckungsübersicht) unter „Targeted regions overview“ (Übersicht der Zielregionen) angezeigt (siehe Tabelle 8). Die Read-Spezifität beträgt für das Beispiel 92 %. Wir empfehlen eine Read-Spezifität über 80 %.

Tabelle 7. Bericht „Mapping summary report“ (Mapping-Übersicht)

Statistikübersicht					
	Anzahl	Prozentsatz der Reads	Mittlere Länge	Anzahl der Basen	Prozentsatz der Basen
Literatur	25	–	123.827.759,24	3.095.693.981	–
Zugeordnete Reads	3.012.232	98,91 %	143,92	433.521.188	99,16 %
Nicht zugeordnete Reads	33.274	1,09 %	110,32	3.670.839	0,84 %
Reads in Paaren	2.962.962	97,29 %	148,38	426.681.289	97,60 %
Gebrochene gepaarte Reads	49.270	1,62 %	138,82	6.839.899	1,56 %
Reads Gesamt	3.045.506	100 %	143,55	437.192.027	100 %

Tabelle 8. „Targeted regions overview“ (Übersicht der Zielregionen)

Referenz	Gesamt zugeordnete Reads	Zugeordnete Reads in Zielregion	Spezifität (%)	Gesamt zugeordnete Reads außer ignoriert	Gesamt zugeordnete Reads in Ziel-region außer ignoriert	Spezifität außer ignoriert (%)
1	0	0	–	0	0	–
2	0	0	–	0	0	–
3	0	0	–	0	0	–
4	0	0	–	0	0	–
5	0	0	–	0	0	–
6	0	0	–	0	0	–
7	0	0	–	0	0	–
8	0	0	–	0	0	–
9	0	0	–	0	0	–
10	0	0	–	0	0	–
11	0	0	–	0	0	–
12	0	0	–	0	0	–
13	1.606.916	1.606.916	100,0	1.606.916	1.606.916	100,0
14	0	0	–	0	0	–
15	0	0	–	0	0	–
16	0	0	–	0	0	–
17	1.200.127	1.200.127	100,0	1.200.127	1.200.127	100,0
18	0	0	–	0	0	–
19	0	0	–	0	0	–
20	0	0	–	0	0	–
21	0	0	–	0	0	–
22	0	0	–	0	0	–
X	0	0	–	0	0	–
Y	0	0	–	0	0	–
MT	0	0	–	0	0	–
Gesamt	2.807.043	2.807.043	100,0	2.807.043	2.807.043	100,0

Qualitätskontrollkriterien

- Die Abdeckung pro Amplifikat muss für die Positivkontrolle NA12878 mindestens 200x betragen.
Tiefe und Abdeckung des Reads zwischen den Amplifikaten sind ausreichend, um die Validierung des Sequenzierungslaufs und Sequenzierungs-Alignments zu gewährleisten.
- Die Abdeckung pro Amplifikat muss für die Proben mindestens 200x betragen.
Dadurch wird die Homogenität der Abdeckung und die Qualität der Proben gewährleistet.
- Über 80 % der Reads werden für die Positivkontrolle NA12878 mit der Zielregion aligniert, um die Spezifität der Primer zu gewährleisten.
- Über 80 % der Reads werden für die Proben mit der Zielregion aligniert, um die Spezifität der Primer zu gewährleisten.

Wenn diese Qualitätskontrollkriterien nicht eingehalten werden, sehen Sie die Informationen unter „Fehlerbehebung“ auf Seite 46 ein.

Interpretation der Ergebnisse

Exportieren Sie die Datei wie unten beschrieben für jede Probe im Format VCF (Variant Call Format) und fügen Sie sie zur gewünschten *BRCA1/BRCA2*-Variantendatenbank hinzu, um die klinische Signifikanz der Varianten zu bestimmen. Überprüfen Sie für Varianten mit einer klinischen pathologischen Bedeutung, ob die identifizierte Variante in der Liste der identifizierten falsch-positiven Varianten enthalten ist (siehe „Falsch-positive Varianten“ auf Seite 63 und in Tabelle 16 auf Seite 68).

Achten Sie insbesondere auf die Art der Sequenz, in der eine Variante identifiziert wurde:

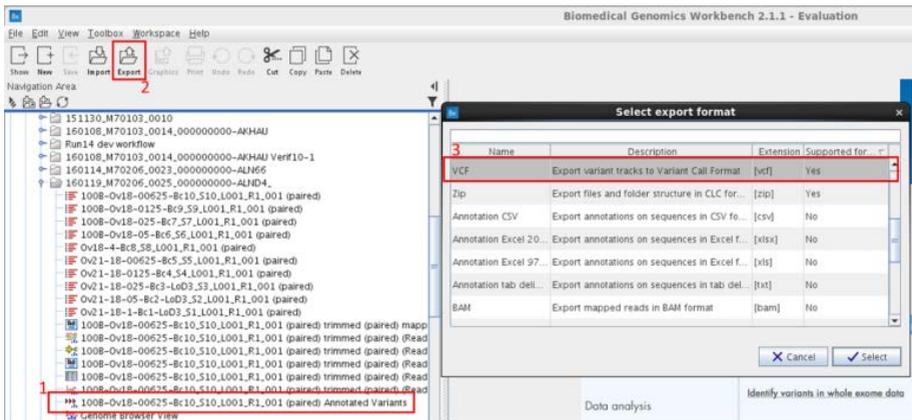
- Intronische Sequenz
- Exonische Sequenz
- Benachbart/flankierend (= 20 nt vor und nach der Zielregion)
- Homopolymer
- Nukleotid-Stretch-Region

Hinweis: Homopolymere (> 6 Nukleotide) und Nukleotid-Stretch-Regionen (Di- oder Tri-Nukleotid-Repeats) stellen eine Quelle für falsch-positive Identifizierungen dar. Die zugehörigen Varianten müssen mit Vorsicht bewertet werden. Wir empfehlen, zur Bestätigung ein Versuch mit einer alternativen Sequenzierungsmethode (z. B. Sanger-Sequenzierung) durchzuführen.

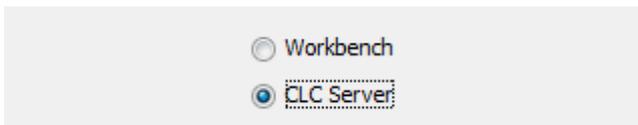
Hinweis: Die Interpretation der Varianten sollte von einem klinischen Genetiker durchgeführt werden.

Exportieren einer VCF-Datei

1. Wählen Sie im Panel **Navigation Area** (Navigationsbereich) die Datei „Annotated Variants“ aus (1).
2. Klicken Sie auf der Symbolleiste auf die Schaltfläche **Export** (Exportieren) (2).
3. Wählen Sie im Fenster **Select export format** (Exportformat auswählen) die Option **VCF** (3) aus. Klicken Sie dann auf **Select** (Auswählen).

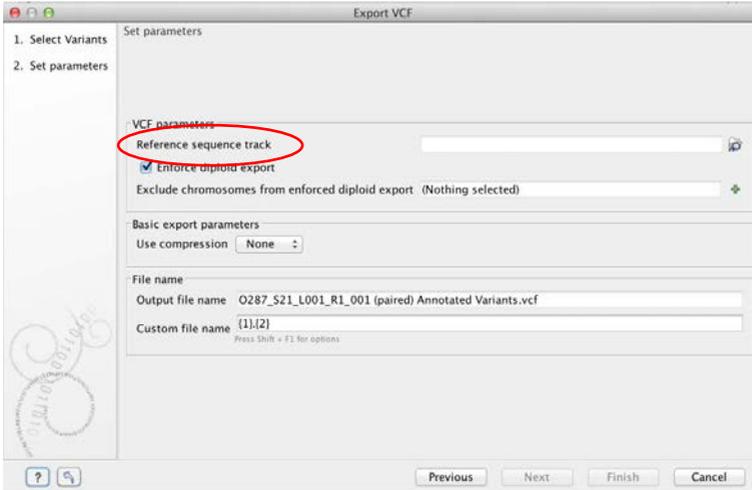


4. Wenn Sie bei einem CLC-Server angemeldet sind, werden Sie gefragt, ob der Exportvorgang mit der Workbench oder dem CLC-Server durchgeführt werden soll. Wählen Sie **Workbench** oder **CLC Server** aus.



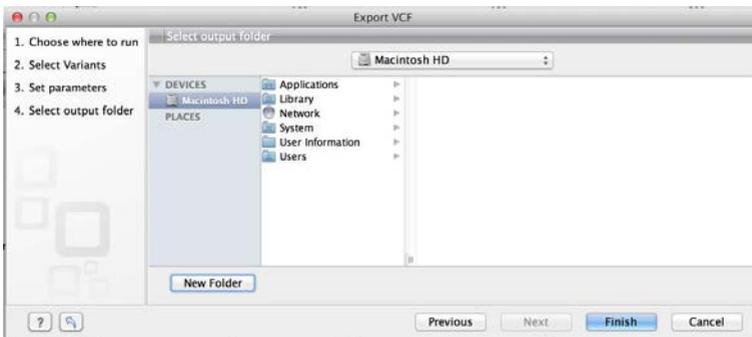
5. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).

6. Bestätigen Sie die Auswahl der Daten, die exportiert werden sollen. Das Dialogfeld **Export VCF** (VCF exportieren) wird geöffnet.



Hinweis: Beim ersten Gebrauch muss die Option **Reference sequence track** (Referenzsequenzspur) im folgenden Pfad aktiviert werden:
CLC_References/homo_sapiens/sequence/hg19/Homo_sapiens_sequence_hg19.

7. Klicken Sie auf **Next** (Weiter).



8. Wählen Sie den Exportordner aus und klicken Sie auf **Finish** (Fertigstellen).

Fehlerbehebung

Die hier beschriebenen Anleitungen sollen Sie bei der Behebung von Fehlern unterstützen, die bei der Bestimmung des *BRCA1/2*-Mutationsstatus mit dem *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA Kit auftreten können. Kontaktinformationen finden Sie auf der hinteren Umschlagseite und unter www.qiagen.com.

Weitere Informationen zur Fehlerbehebung in Bezug auf die anderen Kits finden Sie in den Handbüchern des entsprechenden Kits.

Weitere Informationen zur Fehlerbehebung in Bezug auf das Illumina MiSeqDx Instrument und die zugehörige Software, einschließlich der Biomedical Genomics Workbench Software und des Arbeitsablaufs *BRCA 1/2* CE-IVD, finden Sie in den zugehörigen Benutzerhandbüchern und Handbüchern.

Kommentare und Vorschläge

Geringe Ausbeute der Ziel-DNA

- a) gDNA-Konzentration überprüfen

Wir empfehlen, zur Quantifizierung von gDNA aus FFPE-Ausgangsmaterial ein Fluorometer zu verwenden.

Die gDNA-Konzentration muss über 2,5 ng/µl liegen, um sicherzustellen, dass für die nachfolgenden Analysen eine ausreichende Probenmenge vorhanden ist. Das Kit ist für eine Menge von 10 ng gDNA pro PCR-Zielreaktion optimiert (insgesamt 40 ng).

Kommentare und Vorschläge

- b) Überprüfen Sie die Konzentration der Positivkontrolle, die nach dem Pooling und der Aufreinigung der Ziel-PCR (T-PCR) erhalten wird.
- Wenn die Konzentration der Positivkontrolle NA12878 unter 20 ng/µl liegt, ist bei der T-PCR oder im Pooling- und Aufreinigungsschritt u. U. ein Fehler aufgetreten.
- Wiederholen Sie den T-PCR-Schritt für alle Proben.
- c) Überprüfen Sie nach dem T-PCR-Pooling und der Aufreinigung die Konzentration der Proben.
- Eine Probenkonzentration unter dem Kriterium der Qualitätskontrolle von 4 ng/µl zeigt eine mögliche Zersetzung der DNA an.
- Wiederholen Sie die Extraktion der DNA von der betroffenen Probe.

Geringe Ausbeute der Bibliothek

- a) Überprüfen Sie die T-PCR-Ausbeuten.
- Die Konzentrationen der Positivkontrolle und der Proben müssen nach der T-PCR und vor der Bibliothekspräparation jeweils über 20 ng/µl und 4 ng/µl liegen.
- Wiederholen Sie den T-PCR-Schritt für alle Proben, wenn die Konzentration der Positivkontrolle zu niedrig ist.
 - Wiederholen Sie die Extraktion der Proben-DNA, wenn die Konzentration einer Probe zu niedrig ist.

Kommentare und Vorschläge

- b) Überprüfen Sie nach der Bibliothekspräparation und der Größenselektion die Konzentration der Positivkontrolle.

Quantifizieren Sie die aufgereinigten und größenselektierten Bibliotheken mit einem Kit zur Quantifizierung der qPCR-Bibliothek, das mit dem Illumina-System kompatibel ist. Wiederholen Sie die Quantifizierung der Bibliothek, wenn die Qualitätskontrollkriterien nicht erfüllt werden.

Wenn die Konzentration der Positivkontrolle NA12878 unter 120 nM liegt, ist bei der Bibliothekspräparation, Größenselektion, PCR-Amplifikation oder PCR-Aufreinigung u. U. ein Fehler aufgetreten.

Starten Sie erneut von der gDNA ausgehend die Bibliothekserstellung für alle Proben.

- c) Überprüfen Sie nach der Bibliothekspräparation und der Größenselektion die Konzentration der Proben.

Quantifizieren Sie die aufgereinigten und größenselektierten Bibliotheken mit einem Kit zur Quantifizierung der qPCR-Bibliothek, das mit dem Illumina-System kompatibel ist. Achten Sie insbesondere auf die im Protokoll beschriebenen qPCR-Qualitätskontrollkriterien.

Wenn die Konzentration einer Probe unter 80 nM liegt, ist bei der Bibliothekspräparation, Größenselektion, PCR-Amplifikation oder PCR-Aufreinigung u. U. ein Fehler aufgetreten.

Starten Sie erneut von der gDNA ausgehend die Bibliothekserstellung für diese Probe.

Kommentare und Vorschläge

Unzureichende Ausgabe von Sequenzierungsdaten (Gesamt-Reads < 3 GB)

Überprüfen Sie die Menge des Bibliotheksmaterials, das zur Illumina-Sequenzierungskartusche zugegeben wurde.

Um zu verhindern, dass Teile der *BRCA1/2*-Zielregion falsch identifiziert werden, wird eine Ausgabemenge der Sequenzierungsdaten von insgesamt 3 GB empfohlen. Starten Sie das Protokoll ab der Quantifizierung der Bibliothek erneut, wenn das Qualitätskriterium von 3 GB nicht erfüllt wird.

Überprüfen Sie die Bilder der Illumina-Durchflusszelle gemäß den Anweisungen des Herstellers.

- Wenn die Bibliothek überladen ist (sättigende Clusterdichte), verringern Sie die zur Kartusche zugegebene Menge der gepoolten Bibliotheken.
- Wenn die Clusterdichte zu niedrig ist, erhöhen Sie die zur Kartusche zugegebene Menge der gepoolten Bibliotheken.

Geringe Sequenzierungsspezifität (% der mit der *BRCA1/2*-Zielregion alignierten Reads)

Überprüfen Sie die mittlere Größe der größten-selektierten und aufgereinigten Bibliotheken.

Wenn das Qualitätskriterium von 80 % Spezifität nicht erfüllt wird, überprüfen Sie die Aufreinigungsqualität, indem Sie die Fragmentgröße der Bibliothek analysieren. Die mittlere Amplifikatgröße sollte ungefähr 280 bp betragen.

Starten Sie das Protokoll erneut ab der T-PCR.

Kommentare und Vorschläge

Geringe Reads-Abdeckung

Überprüfen Sie die Mindestabdeckung pro Amplifikat.

Wenn das Qualitätskriterium einer Abdeckung von 200x nicht erfüllt wird, empfehlen wir Folgendes:

- Stellen Sie sicher, dass die 4 PCR-Zielreaktionen mit den gleichen Volumina gepoolt wurden.
- Überprüfen Sie die Homogenität der Reads in Bezug auf die Anzahl der Reads, die für die 10 Proben und die Positivkontrolle pro Probe erhalten wurden.

Kontamination der Nicht-Template-Kontrolle

a) Überprüfen Sie die Nicht-Template-Kontrolle nach der T-PCR.

Wenn in der Nicht-Template-Kontrolle Probe nachgewiesen wird, ist bei der T-PCR oder bei dem Pooling und der Aufreinigung der Probe u. U. eine Kontamination aufgetreten.

Starten Sie die T-PCR erneut.

b) Überprüfen Sie nach der Bibliothekspräparation und der Größenselektion die Konzentration der Nicht-Template-Kontrolle.

Wenn die Konzentration der Nicht-Template-Kontrolle über 1 nM liegt, ist bei der Bibliothekspräparation, Größenselektion, PCR-Amplifikation oder PCR-Aufreinigung u. U. eine Kontamination aufgetreten.

Starten Sie die T-PCR erneut.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Anwendungseinschränkungen

Das Kit ist zur Anwendung im professionellen Bereich vorgesehen.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung molekularbiologischer Verfahren und das hier beschriebene System speziell eingewiesen und geschult wurden.

Das Kit darf nur mit einem validierten, unter „Zusätzlich benötigtes Material: Analyse“ auf Seite 8 aufgeführten Instrument verwendet werden. Bei der Verwendung des Kits sind die Anweisungen im vorliegenden Handbuch zu beachten.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, müssen unbedingt beachtet werden. Komponenten mit abgelaufenem Verfallsdatum nicht verwenden.

Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ist ausschließlich für gepuffertes, formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe validiert.

Das Illumina MiSeqDx Instrument wurde ausschließlich für die Sequenzierung der Probenbibliothek validiert.

Eine Verwendung dieses Produkts für einen anderen als den vorgesehenen Zweck oder eine Modifikation der Komponenten führt zum Erlöschen der Haftung von QIAGEN.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben, dem Tumorgehalt und der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe ab.

Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ist in Verbindung mit dem Analysenarbeitsablauf nicht für eine Analyse der Kopienzahlvariation (CNV, Copy Number Variation) geeignet.

Jegliche diagnostische Ergebnisse, die mit dem Produkt ermittelt werden, sind im Licht aller relevanten klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.

Leistungsmerkmale

WICHTIG: Die Leistungsmerkmale des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits wurden mit dem Reporting-Tool der Biomedical Genomics Workbench Software unter Verwendung des Arbeitsablaufs BRCA 1/2 CE-IVD bestimmt. Der gesamte Arbeitsablauf sollte vom Laborendbenutzer einer unabhängigen Prüfung unterzogen werden, bevor dieser in den Routinebetrieb integriert wird.

Messbereich des Tests

Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ist in Bezug auf die Abdeckung für alle codierenden *BRCA1*- und *BRCA2*-Regionen, einschließlich eines Flankenbereichs von 20 bp für jedes codierende Exon, ausgelegt. Informationen zur Abdeckung des Kits finden Sie in Tabelle 9.

Tabelle 9. Informationen zur Abdeckung

Abdeckung	Art des Wertes	FFPE 82 Proben	NA12878 67 Proben
Mindestabdeckung	Minimum	1863	813
	Median	5624	4725
	Mittel	5591	5187
	Maximum	11.890	14.187
	% der Daten mit einer Abdeckung $\geq 200\times$	100 %	100 %
Normalisierte Mindestabdeckung* (entspricht 3 GB Daten pro Sequenzierungslauf)	Minimum	1142	539
	Median	3499	3124
	Mittel	3494	3416
	Maximum	7383	9211
	% der Daten mit einer Abdeckung $\geq 200\times$	100 %	100 %

* Die Amplifikatabdeckung pro Sequenzierungslauf wurde normalisiert, indem die mit dem Kit bestimmte Mindestabdeckung mit dem folgenden Verhältnis multipliziert wird: 3 GB (empfohlene Mindestausgabe an Sequenzierungsdaten)/Sequenzierungsausgabe des Laufs (in GB).

Einheitlichkeit der Amplifikation

Eine Analyse der 82 FFPE-Probandensätze ergab, dass 99,29 % der Zielpositionen durch eine Anzahl von Reads abgedeckt ist, die über 20 % der mittleren Abdeckungstiefe beträgt (95%-Vorhersageintervall 96,81–100 %).

Störsubstanzen

Es wurde getestet, welche Auswirkungen die Reagenzien des FFPE-DNA-Extraktionskits und potenzielle Störsubstanzen in den FFPE-Proben auf die Leistungsmerkmale des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits haben. In Bezug auf die DNA- und Bibliotheksquantifizierung, die Sequenzierungsausgabe und die Variantenidentifizierung wurden keine Auswirkungen der Störbedingungen oder Störsubstanzen auf die Leistungsmerkmale festgestellt.

Verschleppung

Die Cluster-Erzeugung und Identifizierung der Proben mit dem Illumina-System beruht auf der Ligation bestimmter Oligonukleotidsequenzen. Das Kontaminationsrisiko wird gesenkt, indem zwischen aufeinander folgenden Läufen abwechselnd 2 Sätze mit jeweils 12 Barcodes verwendet werden.

Die mit dem ersten Adaptersatz barcodierten Proben wurden in einem Sequenzierungslauf verwendet, nämlich in Lauf 1. Es wurden dann zwei zusätzliche Läufe ohne Proben durchgeführt (Lauf 2 und Lauf 3). Die verbleibenden Barcodes aus dem ersten Satz wurden in Lauf 2 und Lauf 3 quantifiziert, um die Kontamination durch Verschleppung zwischen den Läufen zu bestimmen. Der gleiche Versuch wurde mit dem zweiten Satz von Barcodes durchgeführt. Der Gesamtprozentsatz der Kontamination durch Verschleppung von Lauf zu Lauf wurde bestimmt, indem das Verhältnis der Read-Anzahl von Lauf 1 und Lauf 3 unter Verwendung beider Barcode-Sätze verglichen wurde. Dabei wurde berücksichtigt, dass die beiden Barcode-Sätze vom Kunden abwechselnd verwendet wurden.

Die Verschleppung von Lauf zu Lauf – definiert als der Prozentsatz der Reads aus den Proben von Lauf 1, die noch in Lauf 3 (ohne Proben) nachgewiesen wurden – betrug für den ersten und zweiten Barcode-Satz jeweils 0,43 % und 0,47 %.

Zielalignierte Reads (Testspezifität)

Bei den zielalignierten Reads (engl. „on-target reads“) handelt es sich definitionsgemäß um den Prozentsatz der Reads, die von allen für die Probe erhaltenen Reads mit der Zielregion aligniert werden können. Der Prozentsatz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zielalignierte Reads (\%)} = \frac{\text{Mit der Zielregion alignierte Read-Anzahl} \times 100}{\text{Gesamtzahl der Reads}}$$

Zur Bestimmung der zielalignierten Reads wurden 82 Datensätze analysiert, die mit Hilfe von 3 verschiedenen Kit-Chargen anhand von 52 FFPE-DNA-Extrakten erfasst wurden. Durchschnittlich wurden 94,51 % der Reads mit der Zielregion aligniert (Tabelle 10).

Tabelle 10. Zielalignierte Reads (Testspezifität)

Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
94,51 %	87,67 %	96,17 %	1,4 %

Präzision des Tests

Die Wiederholbarkeit (Präzision in der Serie) und Reproduzierbarkeit (Präzision von Serie zu Serie) des Tests wurden anhand der Allelfrequenz (AF) bestimmt. Dazu wurden zwei gemischte Proben hergestellt, die eine maximale Anzahl von Varianten mit der erwarteten Allelfrequenz zwischen 5 und 15 % erzeugen. Diese Proben wurden auf 2 MiSeqDx-Plattformen (Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät) mit 3 Bedienern (Reproduzierbarkeit von Bediener zu Bediener) und 3 Kit-Chargen (Variabilität von Charge zu Charge) in 6 Sequenzierumläufen in Doppelbestimmungen getestet.

Ziel war es, die relativen Prozentsätze der Gesamtvariabilität auf jeder Ebene (Charge, Bediener, Gerät, Replikate) zu bestimmen. Eine Analyse der Varianzkomponenten ergab, dass die größte Komponente der Gesamtvarianz die Wiederholbarkeit darstellt, also auf die Doppelbestimmungen in der Serie zurückzuführen ist (siehe Tabelle 11, Spalte Sw).

Tabelle 11. Zusammenstellung aller Varianten, die in 36 Datensätzen von 2 Proben nachgewiesen wurden

Variante Position & Ref.-allel > variantes Allel	Erwartete AF	Berechn., mittl. AF (n = 36)	SA*	VK* (%)	Sw*	Sc*	Sb*	Sg*	Sgesamt*	Zuverlässigkeit†
S1/32913055 A>G	99,9	99,9	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	100,00
S2/32913055 A>G	99,9	99,9	0,05	0,05	0,05	0,01	0,02	0,01	0,05	84,18
S1/32929387 T>C	99,9	99,7	0,16	0,16	0,11	0,09	0,12	0,02	0,18	33,41
S2/32915005 G>C	99,9	99,7	0,38	0,38	0,26	0,22	0,29	0,00	0,44	34,25
S2/32929387 T>C	99,9	99,7	0,19	0,19	0,15	0,10	0,12	0,00	0,21	47,81
S1/32915005 G>C	99,9	99,7	0,45	0,46	0,31	0,27	0,33	0,00	0,53	34,18
S2/32906729 A>C	90,3	90,1	0,85	0,95	0,80	0,00	0,00	0,36	0,88	83,49
S1/32906729 A>C	88,6	91,8	0,70	0,76	0,64	0,00	0,34	0,00	0,73	78,30
S1/32936646 T>C	54,5	52,5	1,78	3,40	1,54	0,48	0,69	0,74	1,90	65,44
S2/32936646 T>C	51	50,2	1,90	3,78	1,40	0,18	1,17	1,02	2,09	44,49
S1/32913691 C>T	43,9	46,2	1,68	3,64	1,56	0,00	0,25	0,72	1,73	80,86
S1/41251931 G>A	42,5	43,1	1,31	3,04	1,11	0,00	0,71	0,46	1,40	63,31
S2/32913691 C>T	42,3	44,9	1,27	2,84	1,10	0,00	0,79	0,00	1,35	65,87
S2/41251931 G>A	41	43,5	1,75	4,01	1,39	0,00	1,23	0,33	1,89	54,60

Variante Position & Ref.-allel > variantes Allel	Erwartete AF	Berechn., mittl. AF (n = 36)	SA*	VK* (%)	Sw*	Sc*	Sb*	Sg*	Sgesamt*	Zuverlässigkeit†
S2/41244000 T>C	14,3	9,6	0,99	10,27	0,99	0,00	0,00	0,00	0,99	100,00
S2/41231516 C>T	14,2	12,9	0,94	7,29	0,65	0,00	0,65	0,50	1,05	39,14
S2/41219780 T>C	14,2	12,2	0,98	8,05	0,91	0,00	0,44	0,00	1,01	81,35
S2/41219804 T>C	14,2	12,2	0,97	7,95	0,91	0,00	0,41	0,00	1,00	83,03
S2/41244435 T>C	14,2	11,9	0,66	5,58	0,62	0,00	0,11	0,25	0,68	83,56
S2/41245466 G>A	14,2	11,8	0,96	8,17	0,93	0,00	0,21	0,16	0,97	92,56
S2/41234470 A>G	14,2	11,7	0,57	4,90	0,54	0,00	0,15	0,19	0,59	83,18
S2/41245237 A>G	14,2	11,6	1,12	9,65	1,07	0,00	0,21	0,33	1,14	88,24
S2/41244936 G>A	14,2	11,5	0,87	7,55	0,73	0,00	0,40	0,39	0,92	62,78
S2/41223094 T>C	14,2	11,4	0,65	5,70	0,62	0,00	0,22	0,00	0,66	88,91
S2/41215416 T>C	13,6	9,3	0,78	8,43	0,78	0,00	0,00	0,00	0,78	100,00
S1/32890572 G>A	9,6	6,6	0,72	10,95	0,72	0,00	0,11	0,00	0,72	97,88
S2/32929232 A>G	9,5	12,4	0,76	6,13	0,76	0,00	0,00	0,00	0,76	100,00
S1/32929232 A>G	9,5	6,7	0,68	10,07	0,68	0,00	0,00	0,00	0,68	100,00
S2/32911888 A>G	9,4	9,5	0,60	6,33	0,52	0,13	0,35	0,00	0,64	65,08
S2/32890572 G>A	9,4	9,1	0,88	9,72	0,80	0,08	0,19	0,40	0,92	76,65
S1/32911888 A>G	9,3	6,2	0,45	7,33	0,42	0,00	0,03	0,20	0,47	81,41
S1/32914236 C>T	9,3	5,8	0,60	10,27	0,55	0,00	0,26	0,12	0,62	78,49

Variante Position & Ref.-allel > variantes Allel	Erwartete AF	Berechn., mittl. AF (n = 36)	SA*	VK* (%)	Sw*	Sc*	Sb*	Sg*	Sgesamt*	Zuverlässigkeit†
S2/32915411 32915414 AATT>	9,2	9,7	0,76	7,83	0,70	0,00	0,26	0,26	0,79	78,35
S1/32915411 32915414 AATT>	9,2	5,6	0,51	9,03	0,50	0,00	0,11	0,00	0,51	95,65
S2/32907259 G>A	9,0	9,6	0,53	5,52	0,53	0,00	0,00	0,08	0,53	97,53
S1/41244936 G>A	5,7	7,0	0,70	9,96	0,57	0,00	0,48	0,00	0,75	59,27
S1/41219780 T>C	5,6	6,9	0,78	11,23	0,73	0,00	0,00	0,33	0,80	83,21
S1/41219804 T>C	5,6	6,9	0,77	11,20	0,72	0,00	0,00	0,34	0,80	81,37
S1/41245237 A>G	5,6	6,6	0,68	10,39	0,69	0,00	0,00	0,00	0,69	100,00
S1/41244000 T>C	5,6	6,4	0,42	6,54	0,41	0,00	0,04	0,10	0,42	93,21
S1/41223094 T>C	5,5	6,3	0,46	7,29	0,44	0,00	0,18	0,00	0,47	85,03
S1/41245471 C>T	5,4	6,6	0,72	10,90	0,67	0,15	0,28	0,00	0,74	81,60
S1/41234470 A>G	5,4	6,5	0,56	8,61	0,54	0,00	0,09	0,15	0,57	90,40
S1/41245466 G>A	5,4	6,5	0,68	10,55	0,62	0,00	0,35	0,00	0,71	75,93
S1/41231516 C>T	5,4	6,4	0,62	9,81	0,54	0,00	0,35	0,13	0,66	68,51
S1/41244435 T>C	5,4	6,3	0,66	10,61	0,63	0,00	0,24	0,00	0,68	87,22
S2/32913603 G>A	5,3	4,9	0,68	14,02	0,65	0,00	0,25	0,10	0,70	85,68

* SA: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient (Sgesamt/Mittelwert) Sw: SA Wiederholbarkeit (Präzision in der Charge), Sc: SA von Charge zu Charge, Sb: SA von Bediener zu Bediener, Sg: SA von Gerät zu Gerät, Sgesamt: SA Gesamt (Präzision im Labor)

† Zuverlässigkeit = $(Sw^2/Sgesamt^2) \times 100$

Nachweisgrenze (LOD)

Cut-off-Wert des Tests

Der Cut-off-Wert des Tests ist die Allelfrequenz, für die 99,9 % der detektierten Varianten richtig-positive Varianten darstellen, nachdem die in den Tabellen 13, 14 und 16 aufgeführten falsch-positiven Varianten entfernt wurden. Für die zuvor charakterisierten 53 Proben wurde für die Allelfrequenz der Variante (VAF) ein Cut-off-Wert von 5,75 % bestimmt. Zu den zuvor charakterisierten Proben gehörten 13 Proben aus dem Bestand des Coriell Institute for Medical Research und 20 klinische FFPE-Proben, die unter Verwendung von 3 Kit-Chargen in Doppelbestimmungen getestet wurden.

Um zu belegen, dass mit dem Test eine VAF von 1,5 % nachgewiesen werden kann, wurden 4 einzelne aus FFPE-Tumorgewebe gewonnene DNA-Proben in verschiedenen Verhältnissen mit einer anderen DNA-Probe aus FFPE-Tumorgewebe vermischt. Um zwischen den multiplexierten Proben eine Abnahme der Homogenität darzustellen, wurden die Sequenzierungsläufe mit abnehmender Menge an Probenbibliotheksmaterial, das in die Kartusche geladen wurde, über den Bereich von 4 nM (die empfohlene Menge) bis 0,125 nM durchgeführt. Die Gesamtaufgabe der Bibliothek wurde auf einer konstanten Konzentration von 4 nM gehalten, indem die DNA-Menge der Positivkontrolle NA12878 erhöht wurde.

Die Assay-Sensitivität wurde mittels Probit-Analyse berechnet; die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Bei einer Bibliotheksaufgabe von 4 nM können mit dem Assay Varianten mit einer VAF von 1,54 % nachgewiesen werden.

Tabelle 12. Assay-Sensitivität: bei abnehmender Bibliotheksaufgabe nachweisbare Mindest-VAF

Bibliotheksaufgabe (Probe)	VAF-LOD
4 nM	1,54 %
2 nM	1,54 %
1 nM	1,54 %
0,5 nM	1,93 %
0,25 nM	3,16 %
0,125 nM	3,88 %

Mindestabdeckung zum Nachweis einer VAF von 5,75 %

Es wurde die Mindestabdeckung (Gesamtanzahl der Reads) bestimmt, die zur Identifizierung bei einem VAF-Cut-off-Wert von 5,75 % erforderlich ist. Vier einzelne aus FFPE-Tumorgewebe gewonnene DNA-Proben wurden in verschiedenen Verhältnissen mit einer anderen DNA-Probe aus FFPE-Tumorgewebe vermischt, um VAF-Werte zu erhalten, die sich bei einem medianen VAF-Wert von 5,75 % über den Bereich von 5,25–6,25 % erstrecken. Es wurden mehrere Sequenzierungsläufe durchgeführt. Dazu wurden 2-fache Reihenverdünnungen des gleichen Satzes der gemischten Proben mit Bibliotheksmengen über den Bereich von 4 bis 0,015625 nM verwendet. Wenn z. B. bei einer Bibliotheksaufgabe von 4 nM eine Abdeckung von 15000x erhalten wird, lässt sich die gleiche Variante bei einer Aufgabe von 0,015625 nM mit einer Abdeckung von 59x nachweisen.

Die LOD für jede AF-Klasse wurde anhand einer Probit-Analyse gemäß NCCLS EP17-A2 bestimmt (20). Der endgültige Wert ist die Abdeckung, die für den Nachweis der AF mit einem Konfidenzniveau von 95 % benötigt wird. Ein Beispieldiagramm ist in Abbildung 9 dargestellt.

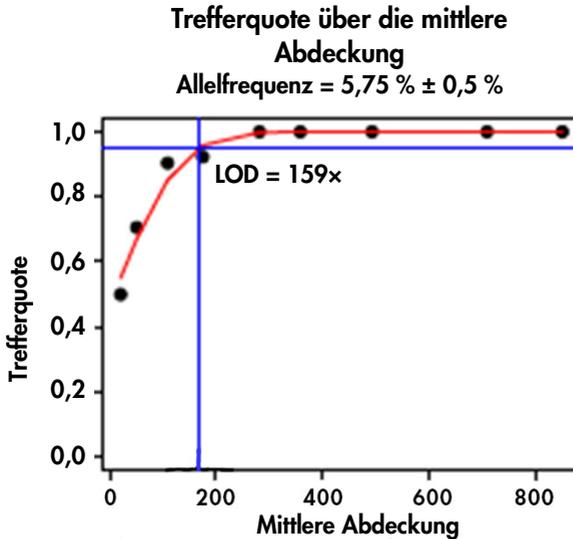


Abbildung 9. Probit-Analyse. Die Trefferquote stellt den prozentualen Anteil der Varianten dar, die gemäß Abdeckung nachweisbar sind.

Für den Nachweis einer VAF von 5,75 % werden mindestens 200 Reads pro Position benötigt. (Die LOD betrug 159x, aufgerundet auf 200x.)

Richtigkeit

Die Genauigkeit wurde anhand der zuvor charakterisierten Proben bestimmt. Dazu gehörten DNA-Proben aus dem Bestand des Coriell Institute for Medical Research und DNA-Proben, die aus FFPE-Ovarialkarzinomgewebe extrahiert wurden.

- Satz 1: 13 Proben aus dem Bestand des Coriell Institute, die für die Zielregion vollständig charakterisiert wurden (191 erwartete Varianten)
- Satz 2: 27 Proben aus dem Bestand des Coriell Institute, die für 25 pathogene Varianten teilweise charakterisiert wurden (27 erwartete Varianten)

- Satz 3: 20 aus FFPE-Ovarialkarzinomgewebe extrahierte DNA-Proben, die für die Zielregion vollständig charakterisiert wurden (570 erwartete Varianten)

Alle erwarteten Varianten wurden in den Proben des Coriell Institute (Satz 1 und 2) nachgewiesen. Dazu gehörten auch zwei große Deletionen von 40 Nukleotiden in *BRCA1* (*BRCA1*: c.1175_1214del40 p.Leu392Glnfs).

Die Genauigkeit wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Genauigkeit (\%)} = \frac{(\text{Anzahl der richtig-positiven Ergebnisse} + \text{Anzahl der richtig-negativen Ergebnisse}) \times 100}{\text{Zielregion (21.150 Basen)}}$$

Für die FFPE-Proben (Satz 3) wurde für einen VAF-Cut-off-Wert von 5,75 % mittels Probit-Analyse eine Genauigkeit von 99,988 % berechnet.

Limitationen der Varianten

Falsch-positive Varianten

Es wurde für einen Satz zuvor charakterisierter Proben eine Liste mit 47 falsch-positiven Varianten zusammengestellt. Zu den zuvor charakterisierten Proben gehörten 13 Proben aus dem Bestand des Coriell Institute und 20 klinische FFPE-Proben, die in Doppelbestimmungen getestet wurden (n = 53). Falsch-positive Varianten sind auf Limitationen des Geräts zurückzuführen. Verantwortlich hierfür sind Sequenzen mit homopolymeren Regionen > 6 nt und/oder Regionen, die Wiederholungen mit Di- und Trinukleotid-Stretches enthalten. Bei falsch-positiven Varianten kann es sich auch um Artefakte von Primer-Dimeren handeln.

Tabelle 13 enthält eine Liste der falsch-positiven *BRCA1*-Varianten auf Chromosom 17. Die Liste der falsch-positiven *BRCA2*-Varianten auf Chromosom 13 ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Position der falsch-positiven Varianten ist in der ersten Spalte angegeben (Hg19-Koordinaten). Danach folgen die Referenz (REF) und die nachgewiesenen alternativen Nukleotide (ALT). Der prozentuale Anteil der Datensätze, in denen falsch-positive Varianten nachgewiesen wurden (von insgesamt 53 Datensätzen), ist in der Spalte „% Datensätze (n = 53)“ angegeben. Die minimalen, mittleren und maximalen AF-Prozentsätze von den insgesamt 53 Datensätzen sind in den Spalten „Minimale AF (%)\", „Mittlere AF (%)\", und „Maximale AF (%)\", angegeben. Die Varianten werden in 4 Kategorien eingeteilt: „Homopol.“ (falsch-positive Variante aus homopolymeren Regionen > 6 nt), „Primer-Dimer“ (falsch-positive Variante von Primer-Dimer-Artefakten), „Stretch“ (falsch-positive Variante von Di- und Trinukleotid-Wiederholungen) und „Sonstige“ (falsch-positive Variante durch Polymerasesynthese- und/oder Sequenzierungsfehler).

Tabelle 13. Liste der falsch-positiven *BRCA1*-Varianten auf Chromosom 17

Region	REF	ALT	Typ	% Datensätze (n = 53)	Minimale AF (%)	Mittlere AF (%)	Maximale AF (%)	Klassifikation falsch-pos. Varianten
41231323	C	T	SNV	9,4	1,3	2,0	2,5	Sonstige
41231324	G	A	SNV	9,4	1,1	1,4	2,6	Sonstige
41231333	G	C	SNV	7,5	1,0	1,5	1,7	Stretch
41231352	T	C	SNV	9,4	1,4	1,8	2,1	Sonstige
41231370	C	A	SNV	5,7	1,1	1,2	1,3	Sonstige
41231401	C	T	SNV	1,9	1,4	1,4	1,4	Sonstige
41231404	T	C	SNV	11,3	1,2	2,4	3,8	Sonstige
41231419	G	A	SNV	9,4	1,3	2,5	3,4	Sonstige
41242939..41242940	CA	-	Deletion	100	3,1	4,8	6,1	Stretch
41243524	A	C	SNV	92,5	1,1	1,7	2,7	Primer-Dimer
41244613	G	A	SNV	3,8	2,0	2,1	2,1	Sonstige
41245586^41245587	-	T	Insertion	96,2	1,1	1,4	2,4	Homopol.
41245587	T	-	Deletion	100	2,3	3,2	3,9	Homopol.
41246532	T	-	Deletion	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol.
41246926	A	-	Deletion	94,3	1,0	1,4	2,0	Homopol.
41267808	G	-	Deletion	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol.
41276152^41276153	-	AT	Insertion	94,3	1,1	1,5	2,0	Stretch
41276153..41276154	AT	-	Deletion	100	1,9	2,7	3,3	Stretch

Tabelle 14. Liste der falsch-positiven *BRCA2*-Varianten auf Chromosom 13

Region	REF	ALT	Typ	% Datensätze (n = 53)	Minimale AF (%)	Mittlere AF (%)	Maximale AF (%)	Klassifikation falsch-pos. Varianten
32893197^32893198	-	T	Insertion	100	4,3	5,6	6,8	Homopol.
32893198	T	-	Deletion	100	11,0	12,6	13,5	Homopol.
32893198..32893199	TT	-	Deletion	5,7	1,1	1,2	1,3	Homopol.
32893318	G	A	SNV	3,8	1,3	1,8	2,2	Sonstige
32900364	T	-	Deletion	75,5	1,0	1,3	1,9	Homopol.

Region	REF	ALT	Typ	% Datensätze (n = 53)	Minimale AF (%)	Mittlere AF (%)	Maximale AF (%)	Klassifikation falsch-pos. Varianten
32905197	T	-	Deletion	18,9	1,0	1,1	1,3	Homopol.
32905219^32905220	-	T	Insertion	100	8,8	10,4	11,4	Homopol.
32905219^32905220	-	TT	Insertion	96,2	1,0	1,2	1,6	Homopol.
32905220	T	-	Deletion	100	19,7	21,1	23,1	Homopol.
32905220..32905221	TT	-	Deletion	100	3,8	4,4	5,4	Homopol.
32907421	A	-	Deletion	94,3	2,2	3,1	3,9	Homopol.
32907535^32907536	-	T	Insertion	100	6,8	7,7	10,0	Homopol.
32907535^32907536	-	TT	Insertion	3,8	1,0	1,1	1,1	Homopol.
32907536	T	-	Deletion	100	21,4	23,8	26,3	Homopol.
32907536..32907537	TT	-	Deletion	100	3,6	4,6	6,2	Homopol.
32911074	A	-	Deletion	11,3	1,0	1,2	1,6	Homopol.
32911443	A	-	Deletion	9,4	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32912346	A	-	Deletion	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol.
32913559	A	-	Deletion	100	1,0	1,5	2,0	Homopol.
32913837	A	-	Deletion	18,9	1,0	1,0	1,1	Homopol.
32914828	A	G	SNV	100	2,4	4,1	6,8	Primer-Dimer
32921032	C	T	SNV	3,8	1,4	1,4	1,4	Sonstige
32953633	A	-	Deletion	17,0	1,0	1,1	1,3	Homopol.
32954022^32954023	-	A	Insertion	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32954023	A	-	Deletion	100	2,1	3,3	4,1	Homopol.
32954303	T	-	Deletion	100	1,5	2,3	2,8	Homopol.
32968809	T	-	Deletion	96,2	2,3	2,6	3,2	Homopol.
32972287	T	-	Deletion	5,7	1,0	1,1	1,2	Homopol.
32972526	G	A	SNV	3,8	1,4	1,4	1,4	Sonstige

Falsch-negative Varianten

Zur DNA eines Gens können zusätzliche Basenpaare hinzugefügt (Insertionen) und Basenpaare davon entfernt (Deletionen) werden. Die Anzahl kann 1 bis zu mehreren Tausend betragen. In ihrer Gesamtheit werden diese Mutationen als Indels bezeichnet. Die Leistungsmerkmale des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits wurden durch den Nachweis von Substitutionsvarianten und kleinen Indels (≤ 3 nt) bestimmt. Es wurden zwar große Indels (> 3 nt) nachgewiesen, die Leistungsmerkmale für den Nachweis dieser großen Indels konnten jedoch nicht bestimmt werden.

Das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ist in Verbindung mit diesem Analysenarbeitsablauf nicht für eine Analyse der Kopienzahlvariation (CNV, Copy Number Variation) geeignet.

Die Primer-Bindungsstellen des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits werden so ausgewählt, dass in den ausgewählten Regionen keine Varianten auftreten. Das Vorkommen seltener Varianten an einer Bindungsstelle kann dadurch nicht ausgeschlossen werden. Dies kann zu einer fehlerhaften Amplifikation und zur Maskierung von Mutationen führen, die potenziell von klinischer Relevanz sind. Wenn derartige Vorgänge vermutet werden, empfehlen wir, zur Bestätigung einen Versuch mit einer alternativen Methode durchzuführen.

Validierung

Zur Validierung des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit-Assays wurden unter Verwendung von 2 unabhängigen Kit-Chargen FFPE-Proben von Ovarialkarzinomgewebe getestet. Dabei wurden die Leistungsmerkmale unter normalen Anwendungsbedingungen bestimmt: Aufgabemenge von 40 ng, VAF-Cut-off-Wert von 5,75 % und eine Abdeckung von 200x.

Es wurden insgesamt 171 FFPE-Proben aus Ovarialkarzinomgewebe von 3 kollaborierenden Labors bereitgestellt und charakterisiert: Curie Institute in Frankreich sowie jeweils ein Labor in Deutschland und im Vereinigten Königreich. Die Labors konnten zur Identifizierung der *BRCA1/2*-Varianten eine beliebige Methode verwenden und es wurden unterschiedliche Plattformen, Assays, Softwareanwendungen und Algorithmen zur Variantenidentifizierung eingesetzt.

Zur weiteren Charakterisierung der klinischen Proben wurde von einem externen Dienstleister für die Sequenzierung der Multiplicom *BRCA Tumor MASTR™ Plus Dx Assay* verwendet, um unter Verwendung einer unabhängigen bioanalytischen Plattform Ergebnisse zu erzeugen.

Die Varianten wurden unter Verwendung der Ergebnisse von allen Methoden wie folgt klassifiziert:

- Richtig-positiv: Identifizierung einer Variante auf der Grundlage der Daten des *therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits* und bestätigt mit mindestens einer anderen Methode
- Richtig-negativ: keine Identifizierung von Varianten auf der Grundlage der Daten des *therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits* und der kollaborierenden Labors
- Falsch-positiv: Identifizierung einer Variante auf der Grundlage der Daten des *therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits*, die aber mit anderen Methoden nicht bestätigt werden konnte
- Falsch-negativ: keine Identifizierung einer Variante auf der Grundlage der Daten des *therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits*, die jedoch mit mindestens einer anderen Methode nachgewiesen wurde

Zur Berechnung der Anzahl der richtig-negativen Varianten wurde die Zielregion als die Schnittmenge zwischen den 3 Methoden definiert, in der 19.612 Nukleotide vorkommen. Drei spezielle Varianten außerhalb dieser Zielregion wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Nach dieser Klassifikation wurden unter den 2130 mit den 3 Methoden erhaltenen Varianten eine falsch-negative Variante und 4 falsch-positive Varianten beobachtet. Das abweichende (falsch-negative) Ergebnis für *BRCA1* auf Chromosom 17 ist in Tabelle 15 aufgeführt. Tabelle 16 enthält die abweichenden (falsch-positiven) Ergebnisse für *BRCA2* auf Chromosom 13.

Tabelle 15. Abweichendes Ergebnis mit 3 Methoden (alle Varianten) für *BRCA1* auf Chromosom 17

Genomischer Locus GRCh37	REF*	ALT*	Typ	VAF* (%) <i>therascreen</i> Kit	Erwartete VAF (%)	Klinische Bedeutung	Klassifikation der Variante
41276067	29	–	Deletion	nicht nachgewiesen	71,11	pathogen	Falsch-negativ

* REF: Referenznukleotid, ALT: Alternatives Nukleotid, VAF: Allelfrequenz der Variante, SNV: einzelne Nukleotidvariante

Tabelle 16. Abweichende Ergebnisse mit 3 Methoden (alle Varianten) für *BRCA2* auf Chromosom 13

Genomischer Locus GRCh37	REF*	ALT*	Typ	VAF* (%) <i>therascreen</i> Kit	Erwartete VAF (%)	Klinische Bedeutung	Klassifikation der Variante
32906729	A	C	SNV*	99,83	nicht nachgewiesen	Unbekannt	Falsch-positiv
32912299	T	C	SNV	34,59	nicht nachgewiesen	Unbekannt	Falsch-positiv
32912299	T	C	SNV	71,86	nicht nachgewiesen	Unbekannt	Falsch-positiv
32913709	T	–	Deletion	43,18	nicht nachgewiesen	pathogen	Falsch-positiv

* REF: Referenznukleotid, ALT: alternatives Nukleotid, VAF: Allelfrequenz der Variante, SNV: einzelne Nukleotidvariante

Bei der falsch-negativen Variante *BRCA1* g.41276067 c.19_47del29 handelte es sich um eine große Deletion aus 29 Nukleotiden auf *BRCA1*, die in einer FFPE-Ovarialprobe nachgewiesen wurde. Diese Deletion wurde zuvor mit dem Arbeitsablauf des *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA Kits in einer FFPE-Blasenprobe nachgewiesen.

Es wurden drei falsch-positive einzelne Nukleotidvarianten nachgewiesen. Eine Variante befand sich in der Region *BRCA2* g.32906729 und zwei in der Region *BRCA2* g.32912299. Der Multiplicom Assay zeigt in diesen Regionen mit jeweils 28x, 38x und 0x eine sehr geringe Abdeckung. Eine Untersuchung der Alignment-Dateien der BAM-Sequenz ergab, dass die beiden Varianten an den Allelfrequenzen 28/28 (100 % VAF) und 9/38 (24 % VAF) auftraten. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf einen Amplifikationsausfall zurückzuführen.

Die falsch-positive Variante *BRCA2* g.32913709delT befindet sich im ersten Nukleotid des Amplifikats. Der entsprechende Amplifikationsprimer hybridisiert in einer Sequenz, die die pathogene Variante g.32913703delTACT enthält. Diese Deletion wurde mit dem *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA Kit-Assay nachgewiesen. Die Anwesenheit dieser Deletion könnte als Erklärung für das Fehlalignment des Primers dienen, das zur Entstehung dieser falsch-positiven Variante führte. Diese falsch-positive Variante führt in keinem Fall zu einer falschen Klassifikation einer Patientin, da sie systematisch mit dem Nachweis der wahren pathogenen Variante verbunden ist.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in einer Kontingenztafel (siehe Tabelle 17) und die Ergebnisse der Bestimmung von Sensitivität und Spezifität in Tabelle 18 zusammengefasst.

- Die klinische Sensitivität ist definitionsgemäß die positive Übereinstimmung:
richtig-positiv / (richtig-positiv + falsch-negativ)
- Die klinische Spezifität ist definitionsgemäß die negative Übereinstimmung:
richtig-negativ / (falsch-positiv + richtig-negativ)
- Die Genauigkeit ist definitionsgemäß die Gesamtübereinstimmung zwischen den Testergebnissen und den Ergebnissen der Kollaborationen und der dritten Methode:
richtig-positiv + richtig-negativ / Anzahl der Basen in der Zielregion

Tabelle 17. Kontingenztafel mit den berechneten Leistungsmerkmalen des *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kits

		Ergebnisse der Kollaboration und des Multiplicom Assays (Referenzmethode)		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Ergebnisse des <i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit- Assays	Positiv	2125 richtig-positiv	4 falsch-positiv	2129
	Negativ	1 falsch-negativ	3.351.522 richtig-negativ	3.351.523
	Gesamt	2126	3.351.526	3.353.652

Tabelle 18. Methodenübergreifende Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit

Parameter	Ergebnis	95 % KI
Sensitivität	99,9530 %	99,7382–100 %
Spezifität	99,9999 %	99,9997–100 %
Richtigkeit	99,9998 %	99,9996–100 %

Literatur

1. WHO, IARC GLOBOCAN. (2012) Cancer incidence and mortality worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **63**, 11–30.
3. Kanchi, K.L. et al. (2014) Integrated analysis of germline and somatic variants in ovarian cancer. *Nature Communications* **5**, 3156.
4. Hennessy, B.T. et al. (2010) Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in OvCa. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3570.
5. Gilks, C.B. and Prat, J. (2009) Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum. Pathol.* **40**, 1213.
6. Kurman, R.J. and Shih, le M. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. A proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 433.
7. Pal, T. et al. (2005) BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* **104**, 2807.
8. Risch, H.A. et al. (2001) Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with OvCa. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 700.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609.

-
10. Foley, O.W., Rauh-hain, J.A. and Del Carmen, M.G. (2013) Recurrent epithelial OvCa: an update on treatment. *Oncology* **27**, 288, 298. Review.
 11. Yap, T.A., Carden, C.P. and Kaye, S.B. (2009) Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 167.
 12. Audeh, M.W. et al. (2010) Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent OvCa: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**, 245.
 13. Alsop, K. et al. (2012) BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with OvCa: a report from the Australian OvCa Study Group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2654.
 14. Ledermann, J. et al. (2014) Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous OvCa: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 852.
 15. Burgess, M. and Puhalla, S. (2014) BRCA 1/2-mutation related and sporadic breast and OvCas: more alike than different. *Front. Oncol.* **4**, 19.
 16. Marth, C. et al. (2015) AGO Austria recommendations for genetic testing of patients with OvCa. *Wien Klin. Wochenschr.* **127**, 652.
 17. Casey, G. (1997) The BRCA1 and BRCA2 breast cancer genes. *Curr. Opin. Oncol.* **9**, 88.
 18. Prat, J. (2012) Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* **460**, 237.

-
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) *Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document MM13-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Katalognummer
	Hersteller
	Materialnummer
Rn	R = Revision des Handbuchs; n = Revisionsnummer
	Chargennummer
	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	CE-Markierung der EU-Konformität
	Verwendbar bis
 <N>	Kit enthält Reagenzien für N Reaktionen

Symbol**Bedeutung des Symbols**



Zulässiger Temperaturbereich



Komponenten (d. h. eine Inhaltsliste)



Inhalt



Anzahl (d. h. Gefäße, Flaschen)



Vorsicht



Gebrauchsanleitung beachten



Vor Sonneneinstrahlung schützen

Bestellinformationen

Bestellinformationen für zusätzlich benötigte Produkte und Reagenzien finden Sie in Teil 1 des Handbuchs in Tabelle 1 auf Seite 15.

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit CE (20)	Für 20 Reaktionen: Für die Identifizierung von Varianten in <i>BRCA1</i> und <i>BRCA2</i> mit der Illumina MiSeqDx-Plattform; BRCA Primer Mix 1, BRCA Primer Mix 2, BRCA Primer Mix 3, BRCA Primer Mix 4, HotStarTaq DNA-Polymerase, GR NGS Panel 5x PCR Buffer V2, nukleasefreies Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle	875011

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. Diese stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor angefordert werden.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Dieses Produkt ist für den Gebrauch als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen. QIAGEN Produkte dürfen ohne die schriftliche Genehmigung von QIAGEN nicht weiterverkauft, zum Weiterverkauf abgeändert oder zur Herstellung von zum Verkauf bestimmten Produkten verwendet werden.

Die Informationen in diesem Dokument können ohne Ankündigung geändert werden. QIAGEN übernimmt keine Haftung für mögliche Fehler in diesem Dokument. Dieses Dokument wurde zum Zeitpunkt der Veröffentlichung als vollständig und richtig erachtet. QIAGEN haftet keinesfalls für Schadensersatzansprüche jeglicher Art, die im Zusammenhang mit oder aufgrund der Verwendung dieses Produktes entstehen.

QIAGEN sichert zu, dass seine Produkte den angegebenen Spezifikationen entsprechen. In dem Fall, dass Produkte nicht wie zugesichert funktionieren, ist QIAGEN lediglich zum kostenfreien Austausch der Produkte verpflichtet. Darüber hinaus können vom Kunden keine weiteren Ansprüche geltend gemacht werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, *therascreen*® (QIAGEN-Gruppe); AMD® (Advanced Micro Devices, Inc.); ATI™ (ATI Technologies); Eppendorf® (Eppendorf AG); Windows®, Windows Vista® (Microsoft Corporation); Fedora®, Red Hat® (Red Hat, Inc.); Illumina®, MiSeqDx™ (Illumina, Inc.); Intel® (Intel Corporation); Mac OS® (Apple Computer, Inc.); MASTR™ (Multiplicom N.V.); NVIDIA® (NVIDIA Corporation); OpenGL® (Khronos-Gruppe); SUSE® (SUSE PLC). Bei registrierten Namen, Marken usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Namen bzw. registrierte Marke gekennzeichnet sind.

Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für das *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Lizenzbedingungen können auf der folgenden Website nachgelesen werden: www.qiagen.com

HB-2197-002 1103449 157014158 02/2017

© 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

