

Febbraio 2017

Manuale del kit *therascreen*[®] BRCA1 /2 NGS FFPE gDNA 2^a parte: Analisi

Versione 1

Per l'identificazione delle varianti in *BRCA1* e *BRCA2*

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con la piattaforma Illumina[®] MiSeqDx[™]

CE

REF

875011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2 **MAT**

1103449IT

Indice generale: 2^a parte

Uso previsto	4
Avvertenza	4
Principio della procedura	5
Materiale necessario ma non fornito: Analisi	7
Strumenti per il sequenziamento.....	7
Software per l'analisi delle sequenze.....	7
Requisiti di sistema consigliati da CLC bio.....	7
Requisiti speciali per la mappatura delle letture	8
Requisiti speciali per 3D Molecule Viewer	9
Requisiti di sistema	9
Raccomandazioni per il sistema.....	9
Avvertenze e precauzioni	9
Precauzioni generali.....	10
Procedura: 2 ^a parte	12
Schema del flusso di lavoro	12
Protocollo: Analisi dei dati.....	13
Installazione del flusso di lavoro per l'analisi.....	13
Installazione del plug-in per l'analisi.....	18
Esportazione dei file Illumina FASTQ dallo strumento MiSeq	20
Importazione dei file Illumina FASTQ.....	21
Analisi della sequenza.....	26
Interpretazione dei risultati.....	41

Esportazione di un file VCF	42
Guida alla risoluzione dei problemi	44
Controllo di qualità	49
Limitazioni	49
Caratteristiche prestazionali	51
Intervallo di misurazione del test	51
Uniformità dell'amplificazione.....	52
Sostanze interferenti	52
Carryover	52
Lecture "on-target" (specificità del test).....	53
Precisione del test.....	53
Limite di sensibilità (LOD)	57
Valore limite del test	57
Copertura minima per rilevare la VAF al 5,75%	58
Accuratezza	59
Limitazioni delle varianti.....	61
Varianti false positive	61
Varianti false negative	64
Risultati della validazione	64
Riferimenti bibliografici	69
Simboli.....	72
Informazioni per gli ordini	74

Uso previsto

Il pannello di kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è un test diagnostico molecolare NGS (Next-Generation Sequencing, sequenziamento di nuova generazione) destinato all'uso per l'identificazione delle varianti nelle regioni codificanti dei geni umani *BRCA1* e *BRCA2* in DNA ottenuto da tessuto tumorale ovarico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA può fornire un contributo valido per la classificazione dei carcinomi ovarici.

Avvertenza

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è stato validato con la piattaforma Illumina MiSeqDx e con il software Biomedical Genomics Workbench (con uno specifico flusso di lavoro di analisi).

IMPORTANTE: il manuale è suddiviso in due parti. La 1ª parte contiene un riassunto e una spiegazione, i principi della procedura e la descrizione del flusso di lavoro in un laboratorio umido (wet lab):

- Estrazione del DNA genomico
- Amplificazione PCR del target
- Creazione di pool di campioni e purificazione
- Allestimento della libreria
- Pulizia del DNA ligato agli adattatori
- Dimensionamento
- Amplificazione PCR della libreria purificata
- Pulizia, quantificazione e creazione di pool di librerie
- Preparazione della libreria in pool per il sequenziamento
- Allestimento e avvio del sequenziamento

- Guida alla risoluzione dei problemi

La 2ª parte contiene informazioni sull'analisi dei dati e sulle prestazioni del kit:

- Analisi dei dati
 - Installazione del flusso di lavoro per l'analisi
 - Installazione del plug-in per l'analisi
 - Esportazione dei file Illumina FASTQ da MiSeqDx
 - Importazione dei file Illumina FASTQ
 - Analisi della sequenza
- Interpretazione dei risultati
- Guida alla risoluzione dei problemi
- Caratteristiche prestazionali

IMPORTANTE: il flusso di lavoro è stato concepito e ottimizzato per determinare le prestazioni descritte nella 1ª e nella 2ª parte del presente manuale. È necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni per l'uso fornite. In caso di mancato rispetto delle istruzioni fornite nella 1ª e nella 2ª parte del presente manuale, le responsabilità di QIAGEN decadranno. Prima di inserire il flusso di lavoro nel ciclo d'uso abituale del laboratorio dell'utente finale, sarebbe opportuno svolgere una verifica indipendente del flusso di lavoro nella sua interezza.

Principio della procedura

Il sequenziamento si basa sul protocollo previsto dal produttore del sistema Illumina. I file FASTQ vengono elaborati dal software Biomedical Genomics Cancer Research Workbench con il flusso di lavoro BRCA1/2 CE-IVD. Per ogni campione viene generato un file in formato VCF (Variant Call Format) e, per l'interpretazione delle varianti, si consiglia di utilizzare il software Biomedical Genomics Cancer Workbench.

Per garantire risultati di qualità apprezzabile vengono applicati dei criteri di controllo “in corso” in tutti i diversi passaggi di preparazione della libreria e di sequenziamento (Figura 7). Questi criteri consentono di validare i passaggi del flusso di lavoro, per identificare i campioni che restituiscono risultati di sequenziamento insufficienti o per indicare una potenziale contaminazione.

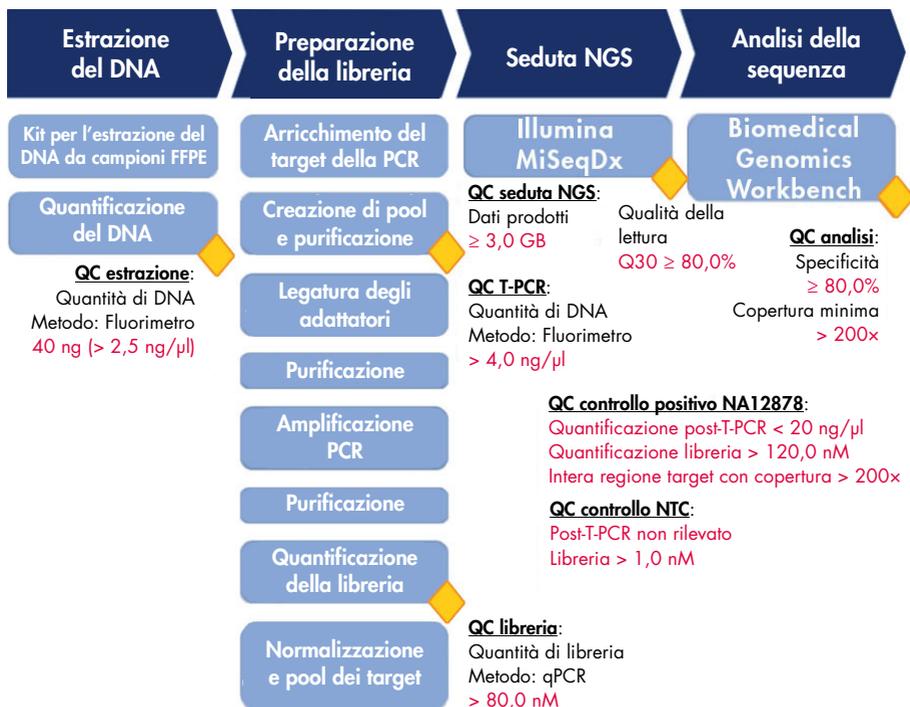


Figura 7. Criteri per il controllo qualità “in corso”. Nel corso del flusso di lavoro di sequenziamento (vignette azzurre) vengono eseguiti svariati controlli (rombi gialli) per validare la T-PCR, la preparazione della libreria e la seduta di sequenziamento. Il criterio di qualità finale che assicura la corretta identificazione delle varianti in una determinata posizione è la copertura minima ottenuta. La specificità riguarda la percentuale di letture delle coppie allineate alla regione target.

Materiale necessario ma non fornito: Analisi

assicurarsi che gli strumenti utilizzati in questa procedura siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

Strumenti per il sequenziamento

- Illumina MiSeqDx (Illumina, Inc.; n. cat. DX-410-1001)
- Software Illumina MiSeq versione 2.5.0.5 o successiva
- Software Illumina Experiment Manager versione 1.9 o successiva

Software per l'analisi delle sequenze

- Biomedical Genomics Workbench versione 2.1.1 di CLC bio (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 con Biomedical Genomics Extension di CLC bio
- QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin
Plug-in disponibile per il download sul sito web QIAGEN, scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.
- BRCA 1/2 CE-IVD Workflow
Flusso di lavoro disponibile per il download sul sito web QIAGEN, scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.

Requisiti di sistema consigliati da CLC bio

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

- Windows Vista®, Windows® 7, Windows 8, Windows 10, Windows Server 2008 o Windows Server 2012
Mac OS® 10.7 o successivo
Linux: Red Hat® 5.0 o successivo; SUSE® 10.2 o successivo; Fedora® 6 o successivo
- Minimo 8 GB di RAM; consigliati 16 GB di RAM

- Minimo schermo da 1024 x 768; consigliato schermo da 1600 x 1200
- Processore Intel® o AMD®
- Minimo 100 GB di spazio libero sul disco nella directory utente temporanea del sistema operativo predefinito
- Minimo 90 GB di spazio libero nella directory CLC_References (se non è presente una connessione a un server)

Se lo spazio libero disponibile sul disco non è sufficiente, è possibile cambiare il percorso per i dati di riferimento. Vedere resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbenchapplication/current/. Espandere la sezione **Getting started** (Per iniziare), aprire **Reference data** (Dati di riferimento) e fare clic su **Download and configure reference data** (Scarica e configura i dati di riferimento).

Requisiti speciali per la mappatura delle letture

I numeri forniti di seguito indicano i requisiti di memoria minimi e consigliati per i sistemi che eseguono le attività di mappatura e analisi. I requisiti sono consigliati sulla base della dimensione del genoma.

- Umano (3,2 GB), di topo (2,7 GB)
 - Minimo: 6 GB di RAM; consigliati: 8 GB di RAM

I sistemi con meno memoria di quella specificata potranno trarre beneficio dall'installazione del plug-in obsoleto read mapper (vedere www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version). La mappatura sarà più lenta dello standard ma è una soluzione al problema della quantità di memoria disponibile.

Requisiti speciali per 3D Molecule Viewer

Requisiti di sistema

- Una scheda grafica in grado di supportare OpenGL® 2.0
- Driver di grafica aggiornati
Assicurarsi di avere installato il driver più aggiornato per la scheda grafica.

Raccomandazioni per il sistema

- Una scheda grafica discreta, prodotta da NVIDIA® o AMD/ATI™
È possibile utilizzare anche le moderne schede grafiche integrate (ad esempio, serie Intel HD Graphics), ma queste sono generalmente più lente delle schede discrete.
- È consigliata una versione workbench a 64 bit per lavorare con complessi di grandi dimensioni

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online in formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e componente del kit QIAGEN.

Precauzioni generali

L'uso dei test NGS deve avvenire nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio, inclusa la manutenzione e la calibrazione di tutte le apparecchiature in uso, e conformemente ai regolamenti e agli standard pertinenti.

- Smaltire campioni e materiali di scarto nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I reagenti contenuti nel kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono diluiti in modo ottimale. Non diluire ulteriormente i reagenti per non rischiare un calo delle prestazioni.
- Tutti i reagenti forniti con il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit. Non sostituire i reagenti del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA con i reagenti di altri kit dello stesso tipo, altrimenti le prestazioni potrebbero risentirne.
- Non utilizzare i componenti del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA e degli altri kit necessari ma non forniti se sono scaduti oppure sono stati conservati o trasportati in modo scorretto. Verificare sempre prima dell'uso.
- In caso di alterazione dei tempi e/o delle temperature di incubazione, i dati generati potrebbero essere erronei o discordanti.
- Procedere con cautela per assicurare il corretto svolgimento dei test sui campioni, con particolare attenzione agli errori di inserimento dei campioni, di caricamento e di lettura del codice a barre.
- Gestire i campioni in modo sistematico per garantire la corretta identificazione e tracciabilità degli stessi in qualsiasi momento.
- Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione crociata.
- Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione da carryover del prodotto della PCR, con conseguente segnale falso positivo.
- Prestare particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione da DNasi, con conseguente degradazione degli stampi di DNA.

-
- Utilizzare materiale da laboratorio privo di nucleasi (ad esempio, pipette, puntali per pipette, fiale di reazione). Utilizzare puntali per pipette nuovi, resistenti alla contaminazione da aerosol, durante tutti i passaggi del pipettamento per evitare la contaminazione crociata di campioni e reagenti.
 - Preparare la miscela Master Mix pre-PCR con materiale dedicato (pipette, puntali e così via) in un'area riservata dove non vengano introdotte matrici di DNA (cDNA, plasmidi o prodotti della PCR). Aggiungere il template in un'area separata (preferibilmente in un'altra stanza) con materiale specifico (pipette, puntali e così via).
 - Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure, consultare il manuale utente dello strumento Illumina MiSeqDx. La piattaforma NGS deve essere installata facendo attenzione all'alimentazione elettrica e, dopo l'avvio, va evitata qualsiasi interazione tra l'utente e la piattaforma.
 - non aprire lo strumento Illumina MiSeqDx finché la seduta non è finita.

Procedura: 2^a parte

Schema del flusso di lavoro

Gli elementi del flusso descritti nello schema sottostante sono stati ottimizzati per la procedura descritta e includono anche i passaggi da eseguire con i kit e i reagenti che non vengono forniti.



Leggere attentamente la procedura descritta e fare riferimento esclusivamente alle istruzioni fornite nella 1^a e nella 2^a parte di questo manuale.

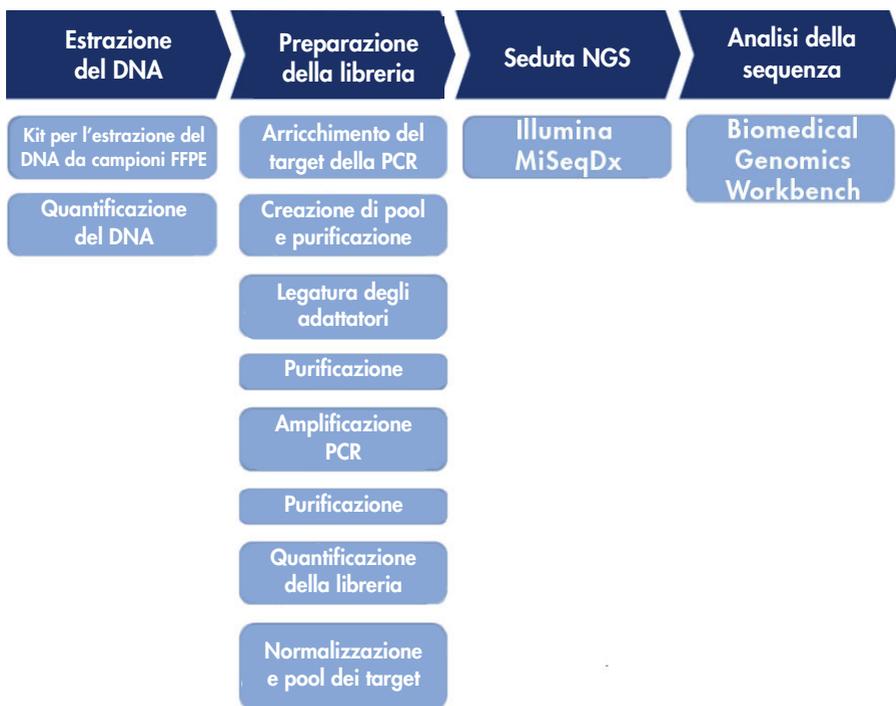


Figura 8. Schema del flusso di lavoro NGS.

Protocollo: Analisi dei dati

Questa sezione include la descrizione dell'installazione del software e dell'analisi dei file FASTQ generati durante il sequenziamento.

Prodotti e software necessari per l'analisi dei dati:

- Software Biomedical Genomics Workbench versione 2.1.1 (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 con Biomedical Genomics Extension (www.clcbio.com)
- I file FASTQ (sono previsti due file FASTQ per campione per le letture accoppiate)

Per eseguire l'analisi delle sequenze, è importante utilizzare uno specifico flusso di lavoro per l'analisi. Si presume che l'utente esegua le analisi del software CLC con un account utente diverso da "admin".

Prima di iniziare

- Se non è già installato, è necessario installare il flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow prima di eseguire l'analisi della sequenza. È disponibile una versione per il download sul sito web QIAGEN nella scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA.
- Se non è già installato, è necessario installare il QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin prima di eseguire l'analisi della sequenza.

Installazione del flusso di lavoro per l'analisi

Sono disponibili due opzioni per installare il flusso di lavoro per l'analisi:

- Installazione locale ("Flusso di lavoro: installazione locale")
- Installazione sul server CLC Genomics (saltare il "Flusso di lavoro: installazione locale" e seguire il "Flusso di lavoro: installazione su server")

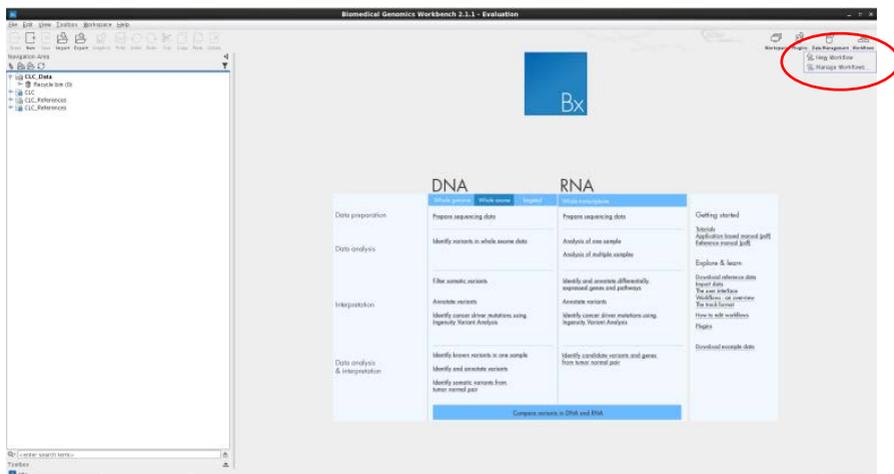
Se il flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow è già installato, saltare il "Flusso di lavoro: installazione locale" e il "Flusso di lavoro: installazione su server".

Flusso di lavoro: installazione locale

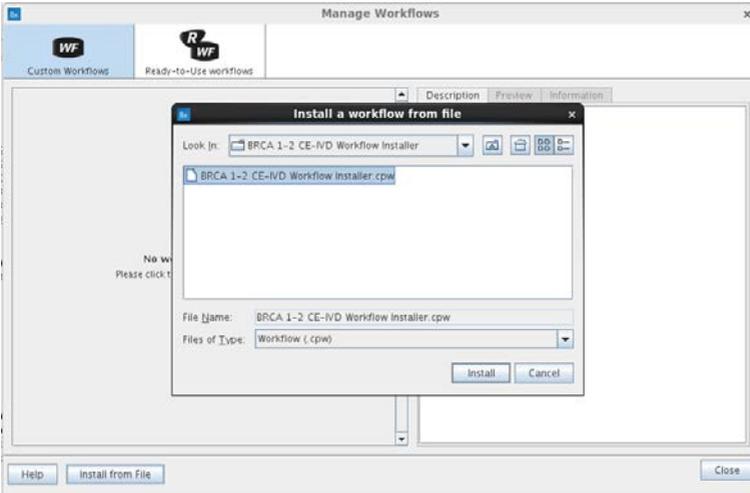
Questa procedura di installazione consente di installare il flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow sullo stesso computer locale in cui è installato il software Biomedical Genomics Workbench.

Procedura

1. Avviare il software **Biomedical Genomics Workbench**.
2. Fare clic su **Workflows** (Flussi di lavoro) e quindi su **Manage Workflows** (Gestisci flussi di lavoro).

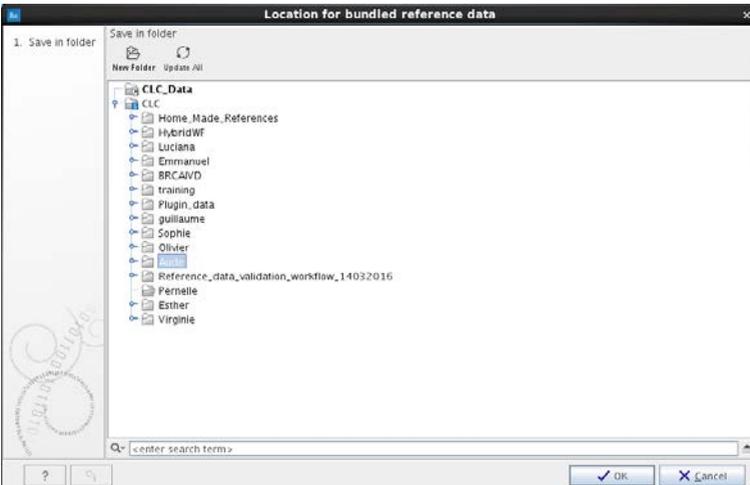


3. Fare clic su **Install from File** (Installa da file).

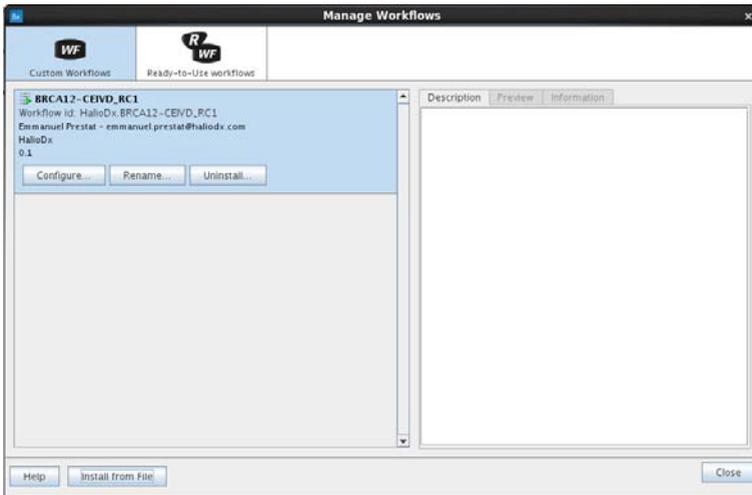


4. Selezionare il file del flusso di lavoro **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw**.
Fare clic su **Install** (Installa).

5. Creare una nuova cartella e selezionarla, quindi fare clic su **OK**.



6. Fare clic su **Close** (Chiudi).



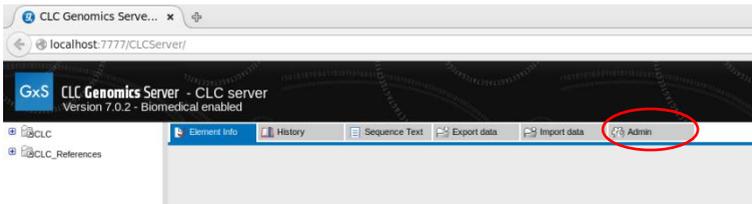
Flusso di lavoro: installazione su server

Questa procedura di installazione consente di installare il flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow sul server CLC Genomics (gestito da Biomedical). Nella procedura seguente, il "serverIP" corrisponde all'indirizzo IP del server, ipotizzando che la porta del server di CLC Genomics sia la "7777" (porta predefinita).

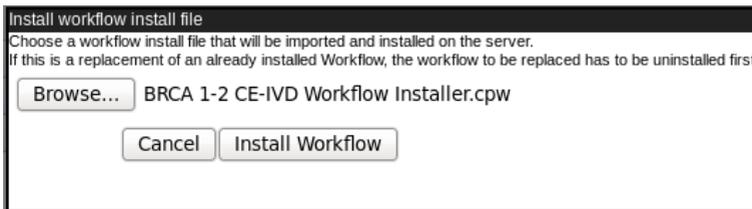
Procedura

1. Utilizzando un browser web, collegarsi all'indirizzo **http://serverIP:7777/**.
Sostituire "serverIP" con l'indirizzo IP del server oppure utilizzare "localhost" se il browser web viene eseguito direttamente dal server.
2. Specificare le credenziali dell'amministratore CLC (per impostazione predefinita, il login è "root" e la password "default").

3. Fare clic sulla scheda **Admin** (Amministratore).



4. Aprire **Workflows** (Flussi di lavoro) e fare clic su **Install Workflow** (Installa flusso di lavoro).



5. Selezionare il file del flusso di lavoro **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw** e fare clic su **Install Workflow** (Installa flusso di lavoro).

Nota: al termine dell'installazione del flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow, è necessario riavviare il software Biomedical Genomics Workbench prima di importare i file FASTQ dallo strumento MiSeq.

Installazione del plug-in per l'analisi

Sono disponibili due opzioni per installare il plug-in per l'analisi:

- Installazione locale (seguire la procedura descritta in "Plug-in: processo di installazione locale")
- Installazione sul server CLC Genomics (saltare "Plug-in: processo di installazione locale" e seguire la procedura "Plug-in: processo di installazione su server")

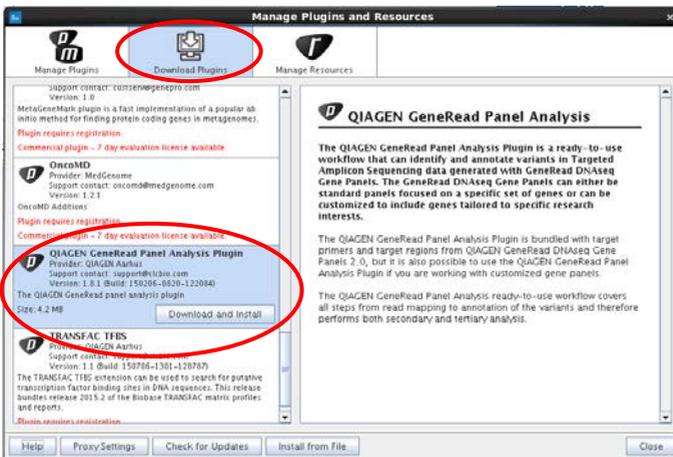
Se il plug-in per l'analisi è già installato, saltare il "Plug-in: processo di installazione locale" e il "Plug-in: processo di installazione su server".

Plug-in: processo di installazione locale

Questa procedura installa il QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin nello stesso computer locale in cui è installato il software CLC Biomedical Genomics Workbench.

Procedura

1. Avviare il software Biomedical Genomics Workbench.
2. Fare clic su **Plugins** (Plug-in), quindi selezionare **Download Plugins** (Download dei plug-in).



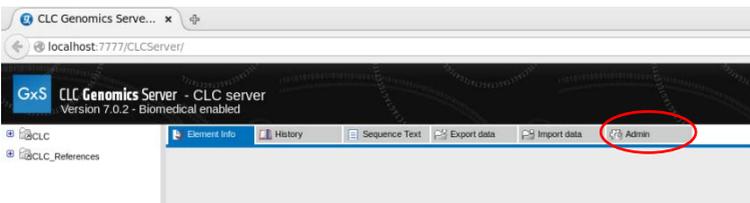
3. Selezionare QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin, quindi fare clic su **Download and Install** (Esegui il download e installa).

Plug-in: processo di installazione su server

Questa procedura consente di installare il QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin sul server CLC Genomics (gestito da Biomedical). Nella procedura seguente, il "serverIP" corrisponde all'indirizzo IP del server, ipotizzando che la porta del server di CLC Genomics sia la "7777" (porta predefinita).

Procedura

1. Utilizzando un browser web, collegarsi all'indirizzo **http://serverIP:7777/**.
Sostituire "serverIP" con l'indirizzo IP del server oppure utilizzare "localhost" se il browser web viene eseguito direttamente dal server.
2. Specificare le credenziali dell'amministratore CLC (per impostazione predefinita, il login è "root" e la password "default").
3. Fare clic sulla scheda **Admin** (Amministratore).



4. Aprire **Plugins** (Plug-in).



5. Nel riquadro **Install new plugin** (Installa nuovo plug-in) scegliere **Browse...** (Sfoglia...) per selezionare la cartella del file.



Installare la versione disponibile per il download di QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin (sito web QIAGEN, scheda **Product Resources** della pagina prodotto dedicata al kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA).

Esportazione dei file Illumina FASTQ dallo strumento MiSeq

I file FASTQ memorizzati nel computer MiSeq devono essere esportati dallo strumento MiSeq a una destinazione di propria scelta (unità esterna o server) per poter essere utilizzati dal software Biomedical Genomics Workbench.

Nota: i file FASTQ si trovano nella seguente cartella delle sedute di sequenziamento:
MiSeqAnalysis\RunID\Data\Intensities\BaseCalls.

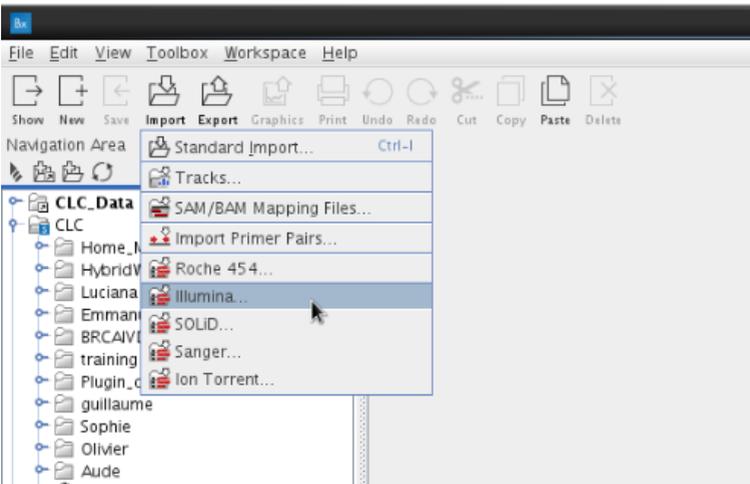
Si consiglia di non tenere a lungo il file dei risultati sulla piattaforma NGS per evitare confusione tra sedute successive e per mantenere sufficiente spazio libero sul disco.

Importazione dei file Illumina FASTQ

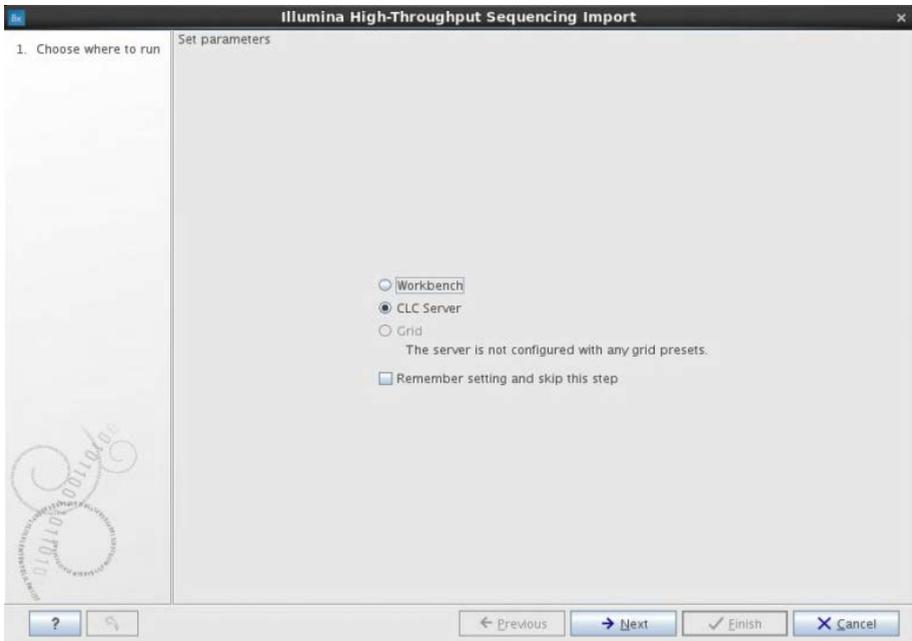
Vi sono due file Illumina FASTQ per campione.

Procedura

1. Aprire il software Biomedical Genomics Workbench.
2. Fare clic su **Import** (Importa) e selezionare **Illumina** nel menu.

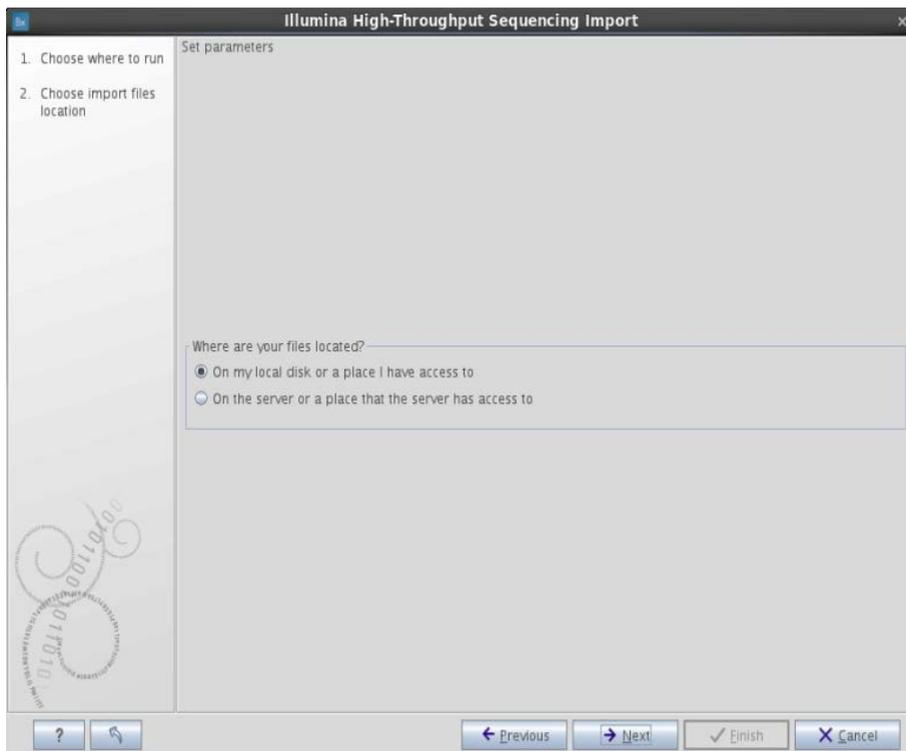


3. Scegliere dove svolgere l'operazione selezionando l'opzione appropriata.
 - Selezionare **Workbench** se il flusso di lavoro BRCA 1/2 CE-IVD Workflow è installato localmente (ad esempio, è stato installato con la procedura "Flusso di lavoro: installazione locale").
 - Selezionare **CLC Server** se il flusso di lavoro BRCA 1/2 CE-IVD Workflow è installato sul server (ad esempio, è stato installato con la procedura "Flusso di lavoro: installazione su server").



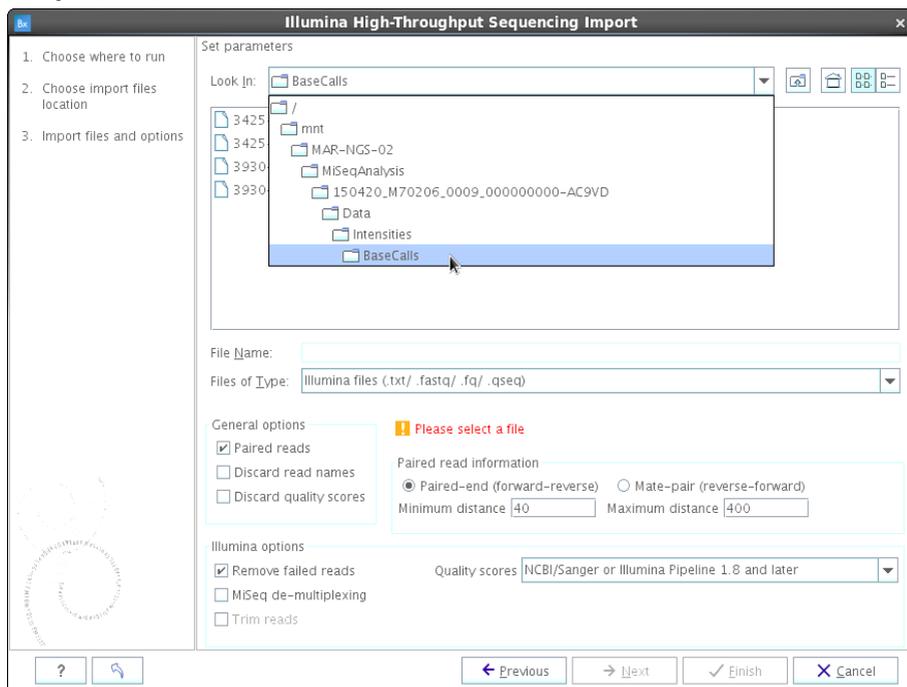
4. Fare clic su **Next** (Avanti).

5. Se nel passaggio precedente è stato selezionato **CLC Server**, viene visualizzata la finestra seguente.



6. Selezionare **On my local disk or a place I have access to** (Sul disco locale o in una posizione a me accessibile) e fare clic su **Next** (Avanti).

7. Selezionare tutti i file FASTQ da analizzare nel seguente percorso nel file MiSeq:
Analysis/Data/Intensities/BaseCalls.

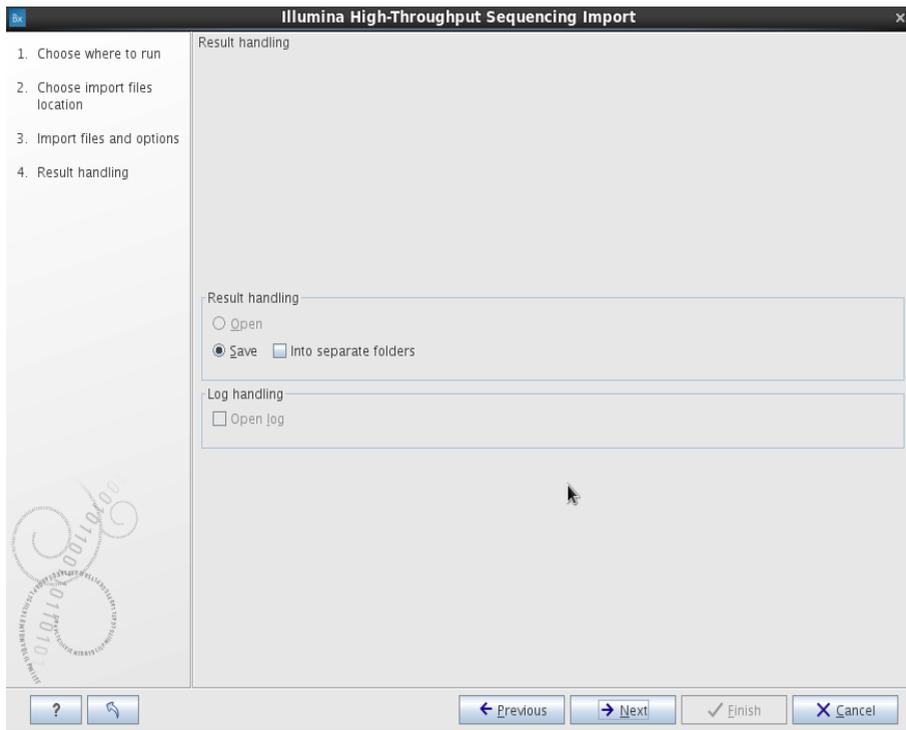


8. Selezionare le impostazioni seguenti:

- Selezionare la casella di controllo **Paired reads** (Lecture accoppiate)
- Selezionare la casella di controllo **Paired-end (forward-reverse)** (Estremità accoppiata, [diretta-inversa])
- Nel campo **Minimum distance** (Distanza minima) specificare **40** e nel campo **Maximum distance** (Distanza massima) specificare **400**
- Selezionare la casella di controllo **Remove failed reads** (Rimuovi letture fallite)

9. Fare clic su **Next** (Avanti).

10. Viene visualizzata la finestra seguente. Selezionare **Save** (Salva) e fare clic su **Next** (Avanti).



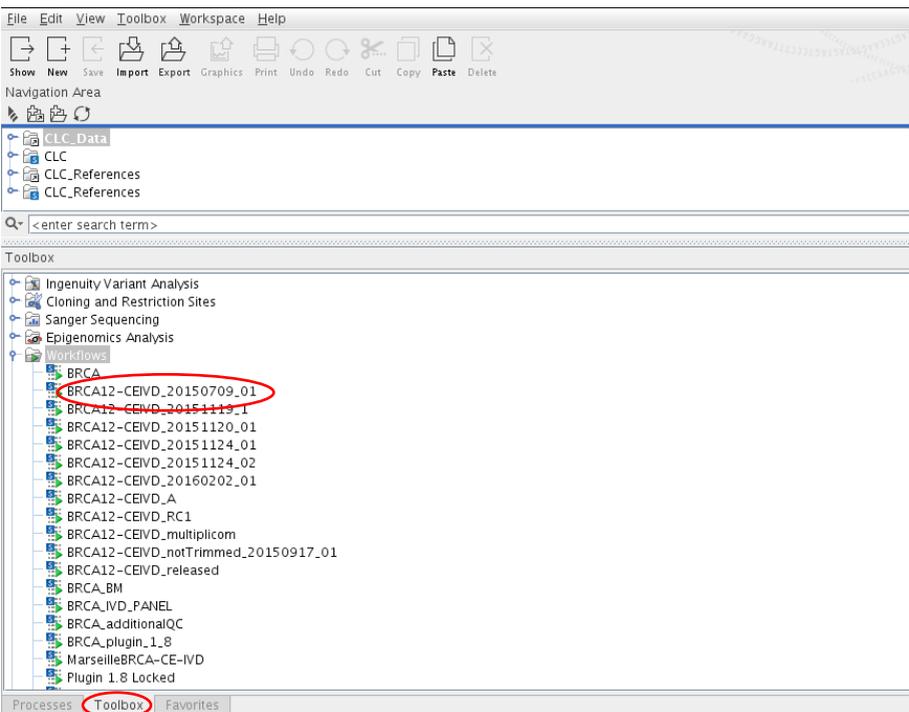
11. Creare una cartella in cui salvare i file FASTQ accoppiati e fare clic su **Finish** (Fine).

Analisi della sequenza

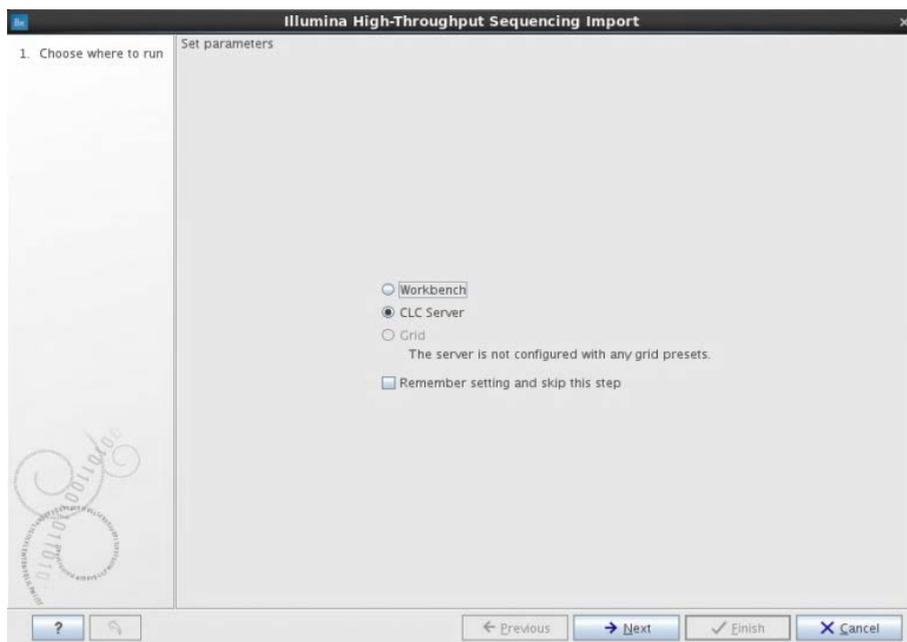
Elaborare i file FASTQ con il flusso di lavoro per l'analisi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow che è stato precedentemente installato con la procedura "Flusso di lavoro: installazione locale" o "Flusso di lavoro: installazione su server". Seguire tutti i passaggi della procedura per l'analisi dei file FASTQ accoppiati, come descritto di seguito.

Procedura

1. Selezionare la scheda **Toolbox** (Casella degli strumenti) e fare doppio clic sul nome del flusso di lavoro.



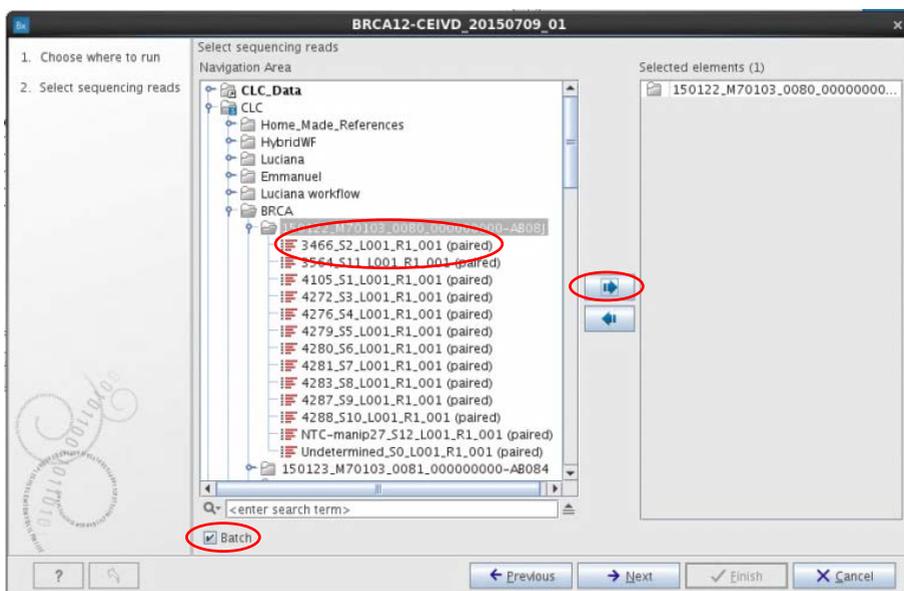
Viene visualizzata la finestra seguente.



2. Selezionare l'opzione pertinente:

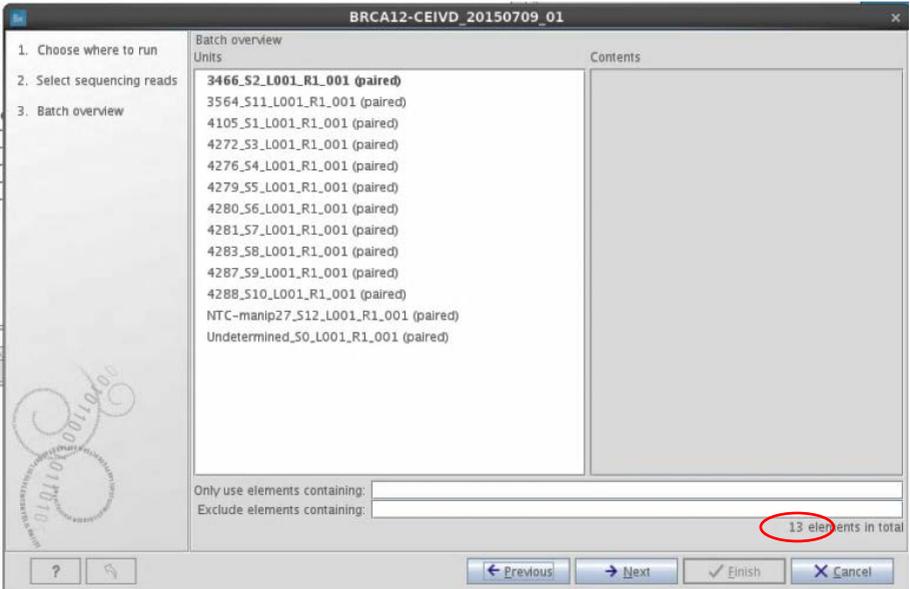
- Selezionare **Workbench** (Flusso di lavoro) se il flusso di lavoro BRCA 1/2 CE-IVD Workflow è installato localmente.
- Selezionare **CLC Server** se il flusso di lavoro BRCA 1/2 CE-IVD Workflow è installato sul server.

3. Fare clic su **Next** (Avanti).



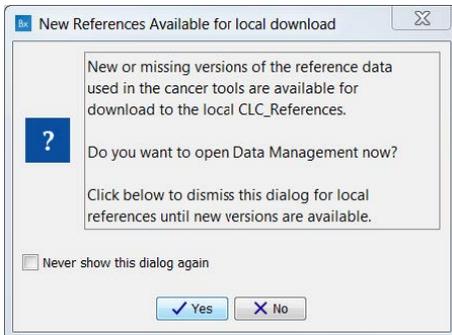
4. Scegliere la cartella che contiene i file FASTQ, selezionare la casella di controllo **Batch** (Lotto) e fare clic sulla freccia blu  per selezionare la cartella.
5. Fare clic su **Next** (Avanti).

6. Confermare visivamente che vi sono 13 elementi selezionati nel riquadro **Units** (Unità). Fare clic su **Next** (Avanti).



Nota: la prima volta che viene utilizzato il flusso di lavoro BRCA 1/2 CE-IVD Workflow, è necessario selezionare i dati di riferimento nella cartella **CLC_References**.

Quando si apre il software Biomedical Genomics Workbench per la prima volta, viene visualizzata una finestra di dialogo con un messaggio per segnalare che i dati di riferimento sono disponibili per il download nell'archivio **CLC_References** locale o sul server.

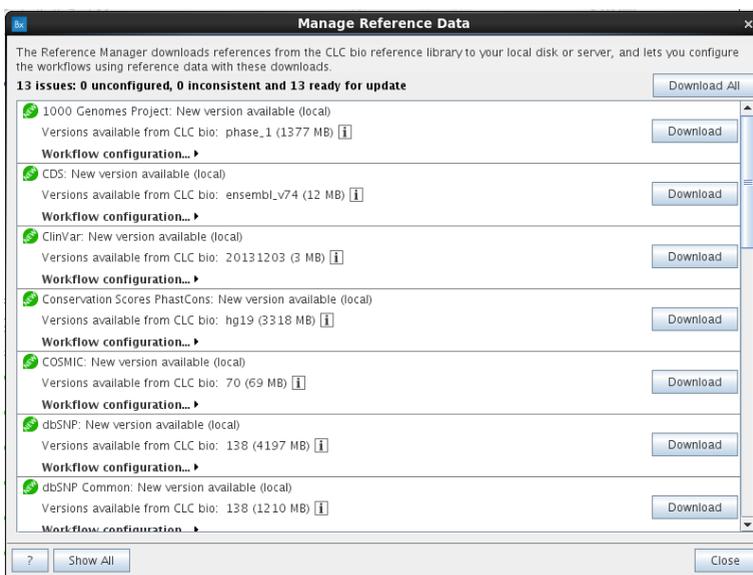


Fare clic su **Yes** (Sì). In questo modo viene visualizzata la procedura guidata **Manage Reference Data** (Gestione dati di riferimento).

È possibile accedere a questa procedura guidata anche dall'angolo in alto a destra del software Biomedical Genomics Workbench, facendo clic su **Data Management** (Gestione dei dati).



Per installare i dati di riferimento, fare clic su **Data Management** (Gestione dei dati) ed eseguire il download dei database di riferimento seguenti: 1000 Genomes Project, CDS, ClinVar, Conservation Scores PhastCons, Cosmic, dbSNP, dbSNP Common, Genes, HapMap, mRNA, Sequence, Target Primers, Target Regions.



Per ulteriori informazioni, fare riferimento a *Biomedical Genomics Workbench Application Manual*, sezione 4.1 “Reference data”.

Selezionare i dati di riferimento in **CLC_References** per eseguire i passaggi dal 7 al 22 riportati più avanti.

Ad esempio, per il passaggio 7 è necessario selezionare i dati di input del flusso di lavoro per CDS dal seguente percorso:

CLC_References/homo_sapiens/cds/ensembl_V74/Homo_sapiens_ensembl_v74_CDS

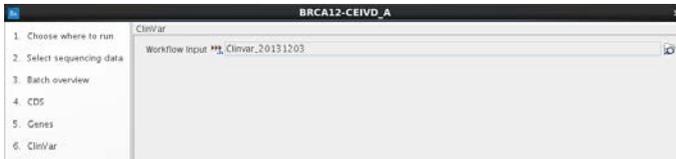
Nota: dopo il primo utilizzo, per i 16 passaggi seguenti (7-22) è richiesto soltanto di fare clic su **Next** (Avanti) in fondo alle varie schermate.



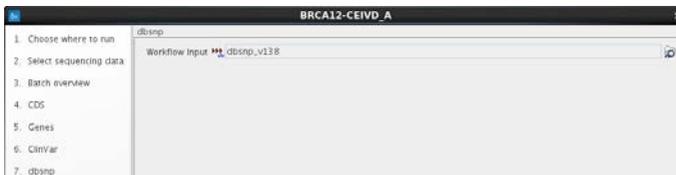
7. Fare clic su **Next** (Avanti).



8. Fare clic su **Next** (Avanti).



9. Fare clic su **Next** (Avanti).



10. Fare clic su **Next** (Avanti).



11. Fare clic su **Next** (Avanti).



12. Fare clic su **Next** (Avanti).



13. Fare clic su **Next** (Avanti).



14. Fare clic su **Next** (Avanti).



15. Fare clic su **Next** (Avanti).



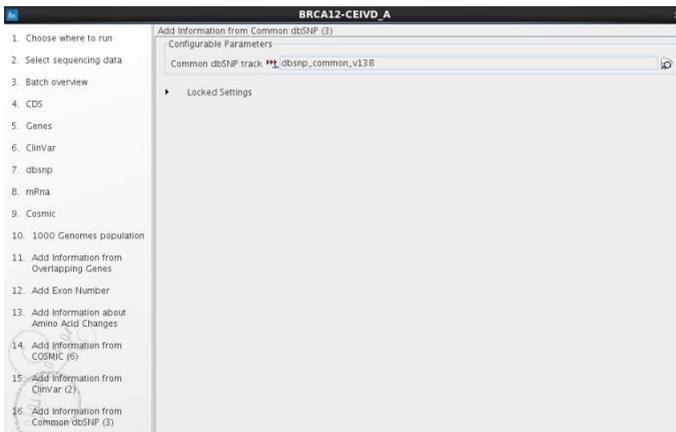
16. Fare clic su **Next** (Avanti).



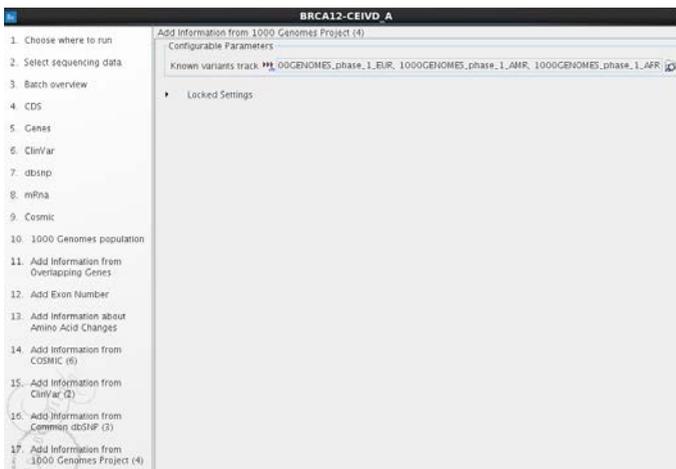
17. Fare clic su **Next** (Avanti).



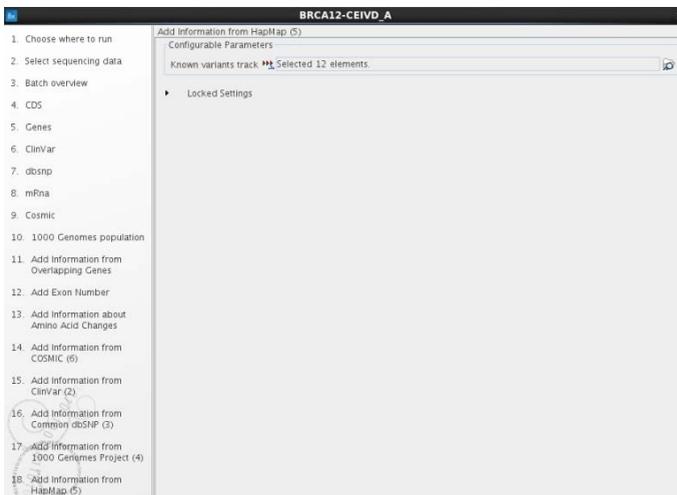
18. Fare clic su **Next** (Avanti).



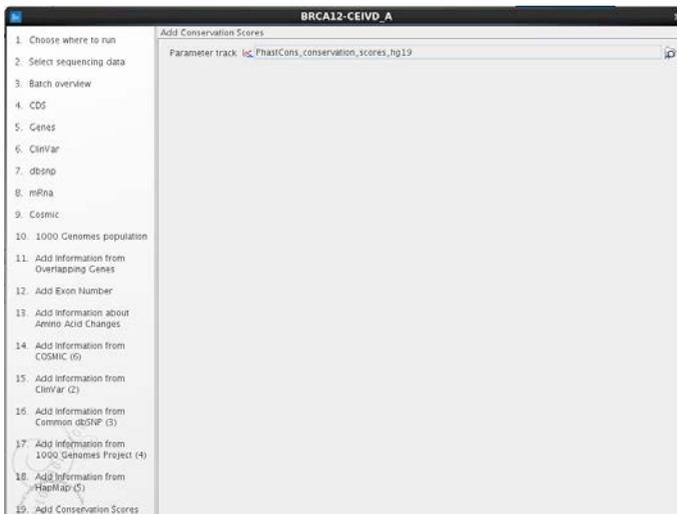
19. Fare clic su **Next** (Avanti).



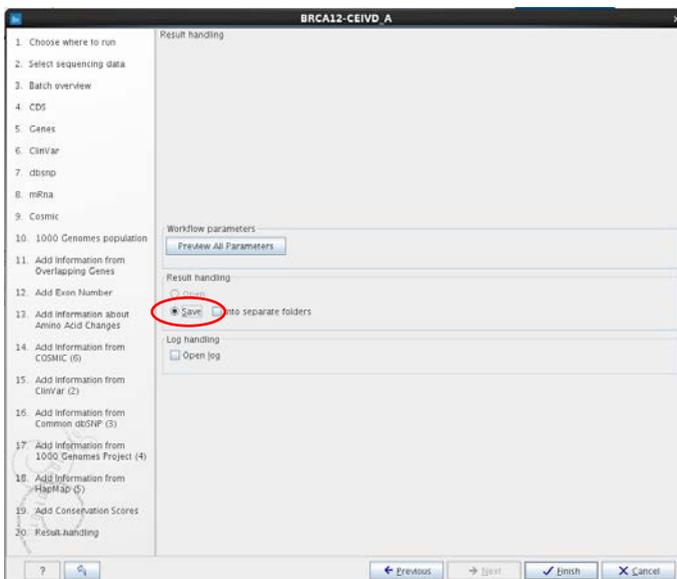
20. Fare clic su **Next** (Avanti).



21. Fare clic su **Next** (Avanti).



22. Fare clic su **Next** (Avanti).



23. Selezionare **Save** (Salva) e fare clic su **Finish** (Fine). L'analisi della sequenza ha inizio. Al termine dell'analisi della sequenza e prima di passare all'analisi delle varianti:

- Verificare che il numero minimo di letture per amplicone per il controllo positivo sia > 200x.
Questo valore indica che c'è una sufficiente omogeneità tra gli ampliconi *BRCA1/BRCA2*.
- Verificare che il numero minimo di letture per amplicone per i campioni sia > 200x.

IMPORTANTE: si consiglia di utilizzare solo target con una copertura di più di 200 letture per l'analisi finale. La copertura minima ottenuta per amplicone è indicata nel report denominato "Locally realigned trimmed reads read mapping (coverage) region statistics".

La specificità della lettura determina la percentuale di letture allineate alla regione target. Per calcolare la specificità del sequenziamento e assicurare che sia sufficiente, aprire il "Mapping summary report" (Report sintetico della mappatura, Tabella 7) e individuare il numero totale di letture, quindi aprire il "Coverage summary report" (Report sintetico della copertura). I dati relativi alle letture allineate alla regione target sono illustrati nella sezione

“Targeted regions overview” (Panoramica delle regioni target) del “Coverage summary report” (Report sintetico della copertura, Tabella 8). Per l’esempio, la specificità della lettura è del 92%. Si consiglia una specificità > 80%.

Tabella 7. Report sintetico della mappatura

Statistiche riassuntive					
	Conteggio	Percentuale di letture	Lunghezza media	N° di basi	Percentuale di basi
Riferimenti	25	–	123.827.759,24	3.095.693.981	–
Letture mappate	3.012.232	98,91%	143,92	433.521.188	99,16%
Letture non mappate	33.274	1,09%	110,32	3.670.839	0,84%
Letture a coppie	2.962.962	97,29%	148,38	426.681.289	97,60%
Letture di coppie spezzate	49.270	1,62%	138,82	6.839.899	1,56%
Letture totali	3.045.506	100%	143,55	437.192.027	100%

Tabella 8. Panorama delle regioni target

Riferimento	Lette mappate totali	Lette mappate nella regione target	Specificità (%)	Lette mappate totali, escluse quelle ignorate	Lette mappate totali nella regione target, escluse quelle ignorate	Specificità, escluse le lette ignorate (%)
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	–
Totale	2.807.043	2.807.043	100,0	2.807.043	2.807.043	100,0

Criteri per il controllo qualità

- Per quanto riguarda il controllo positivo NA12878, la copertura minima deve essere di 200x per amplicone.

C'è una sufficiente profondità di lettura della copertura tra gli ampliconi per garantire la validazione della seduta di sequenziamento e l'allineamento della sequenza.

- Per quanto riguarda i campioni, la copertura minima deve essere di 200x per amplicone.

Questo valore garantisce l'omogeneità della copertura e la qualità dei campioni.

- Per quanto riguarda il controllo positivo NA12878, viene allineato oltre l'80% delle letture alla regione target per garantire la specificità dei primer.
- Per quanto riguarda i campioni, viene allineato oltre l'80% delle letture alla regione target per garantire la specificità dei primer.

Se questi criteri per il controllo qualità non sono soddisfatti, vedere la "Guida alla risoluzione dei problemi", a pagina 44.

Interpretazione dei risultati

Per ogni campione, esportare il file in formato VCF (Variant Call Format) nel modo descritto più avanti e confrontarlo con un database delle varianti *BRCA1/BRCA2* di propria scelta, in modo da determinare l'importanza clinica delle varianti. Per quanto riguarda le varianti con un impatto patologico clinico, verificare se la variante identificata è presente nell'elenco delle varianti false positive (vedere "Varianti false positive" a pagina 61 e nella Tabella 16 a pagina 66).

Prestare attenzione al tipo di sequenza in cui è stata rilevata una variante:

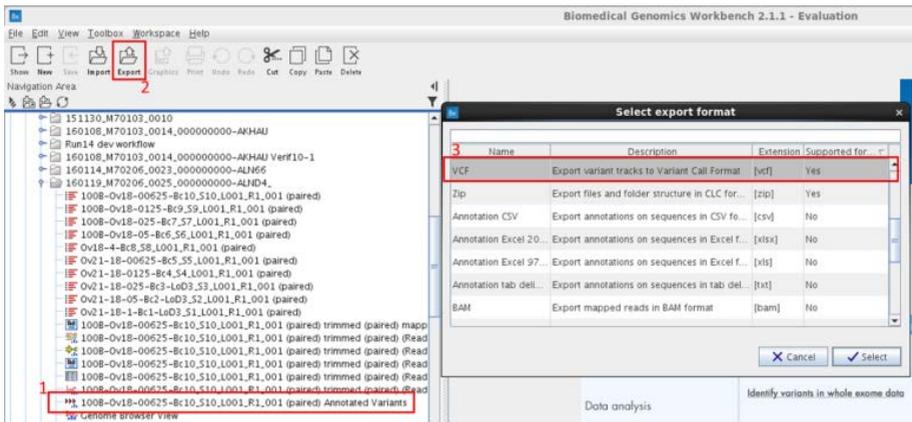
- Sequenza intronica
- Sequenza esonica
- Adiacente/fiancheggiante (= 20 nt prima e dopo la regione target)
- Omopolimero
- Regione del tratto nucleotidico

Nota: gli omopolimeri (> 6 nucleotidi) e le regioni del tratto nucleotidico (ripetizioni dinucleotidiche o trinucleotidiche) possono causare falsi positivi. È opportuno valutare con attenzione le varianti corrispondenti. Si consiglia di eseguire un esperimento di conferma con un altro metodo di sequenziamento (ad esempio, Sanger).

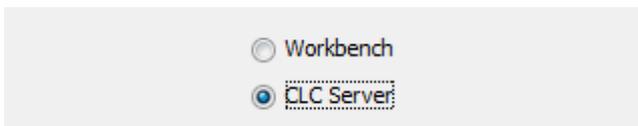
Nota: l'interpretazione delle varianti deve essere affidata a un esperto di genetica clinica.

Esportazione di un file VCF

1. Selezionare il file "Annotated Variants" (Varianti con annotazioni) nel riquadro **Navigation Area** (Area di navigazione) (1).
2. Fare clic sul pulsante **Export** (Esporta) nella barra degli strumenti (2).
3. Nella finestra **Select export format** (Selezione del formato di esportazione), scegliere **VCF** (3) e fare clic su **Select** (Seleziona).

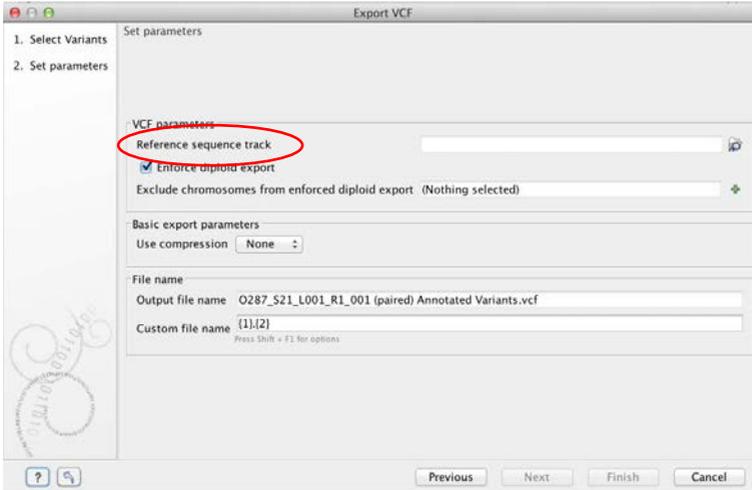


4. In presenza di una connessione a CLC Server, verrà richiesto di scegliere se eseguire l'esportazione con Workbench o CLC Server. Selezionare **Workbench** o **CLC Server**.



5. Fare clic su **Next** (Avanti).

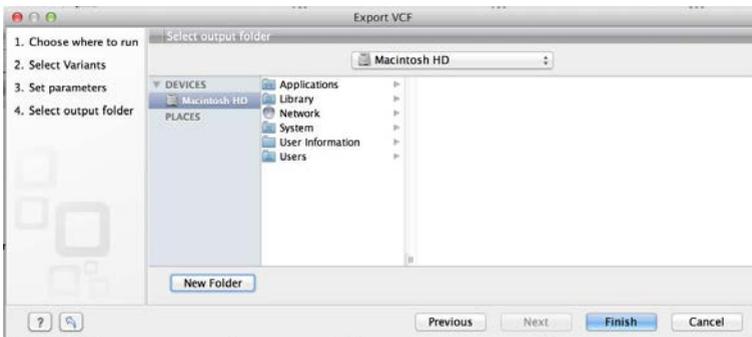
6. Confermare la selezione dei dati da esportare. Viene visualizzata la finestra di dialogo **Export VCF** (Esportazione VCF).



Nota: la prima volta è necessario selezionare **Reference sequence track** (Traccia sequenza di riferimento) dal percorso seguente:

CLC_References/homo_sapiens/sequence/hg19/Homo_sapiens_sequence_hg19.

7. Fare clic su **Next** (Avanti).



8. Selezionare la cartella di esportazione e fare clic su **Finish** (Fine).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni critiche riguardanti la valutazione dello stato della mutazione *BRCA1/2* con il kit *therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA*. Per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com.

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi relativi ad altri kit, consultare i manuali dei kit corrispondenti.

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi relativi allo strumento Illumina MiSeqDx e al software associato, compresi Biomedical Genomics Workbench e *BRCA 1/2 CE-IVD Workflow*, consultare le guide utente e i manuali corrispondenti.

Commenti e suggerimenti

Scarsa resa del DNA target

- a) Controllare la concentrazione del gDNA

Si consiglia di utilizzare un fluorimetro per la quantificazione del gDNA dal materiale FFPE di partenza.

La concentrazione del gDNA deve essere $> 2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ per ottenere una quantità di campione sufficiente per gli esperimenti successivi. Il kit è ottimizzato per 10 ng di gDNA per ogni reazione PCR target (in totale 40 ng).

Commenti e suggerimenti

- b) Controllare la concentrazione del controllo positivo ottenuta dopo la target-PCR (T-PCR), la creazione del pool e la purificazione
- Se la concentrazione del controllo positivo NA12878 è inferiore a 20 ng/μl, potrebbe essersi verificato un errore durante la T-PCR o durante i passaggi di creazione del pool e purificazione.
- Ripetere la T-PCR per tutti i campioni.
- c) Controllare la concentrazione dei campioni dopo la T-PCR, la creazione del pool e la purificazione
- Una concentrazione del campione al di sotto del criterio per il controllo qualità (4 ng/μl) potrebbe essere indicativa di un DNA degradato.
- Ripetere l'estrazione del DNA dal campione che ha generato l'errore.

Scarsa resa della libreria

- a) Controllare le rese della T-PCR
- Dopo la T-PCR e prima di procedere con la preparazione della libreria, le concentrazioni del controllo positivo e dei campioni devono essere rispettivamente > 20 ng/μl e > 4 ng/μl.
- Se la concentrazione del controllo positivo è troppo bassa, ripetere la T-PCR per tutti i campioni.
 - Se la concentrazione di un campione è troppo bassa, ripetere l'estrazione del DNA campione.

Commenti e suggerimenti

- b) Controllare la concentrazione del controllo positivo dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento
- Quantificare le librerie purificate e dimensionate utilizzando un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR che sia compatibile con il sistema Illumina. Ripetere la quantificazione se i criteri per il controllo qualità non sono soddisfatti.
- Se la concentrazione del controllo positivo NA12878 è inferiore a 120 nM, potrebbe essersi verificato un errore durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.
- Ripetere l'allestimento della libreria dal gDNA per tutti i campioni.
- c) Controllare la concentrazione dei campioni dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento
- Quantificare le librerie purificate e dimensionate utilizzando un kit di quantificazione delle librerie mediante qPCR che sia compatibile con il sistema Illumina. Prestare attenzione ai criteri per il controllo qualità della qPCR descritti nel protocollo.
- Se la concentrazione di un campione è inferiore a 80 nM, potrebbe essersi verificato un errore durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.
- Ripetere l'allestimento della libreria dal gDNA per il campione interessato.

Commenti e suggerimenti

Scarso output di dati di sequenziamento (letture totali < 3 GB)

Controllare la quantità di materiale della libreria che è stato aggiunto alla cartuccia di sequenziamento Illumina

Per evitare errori di lettura di sezioni della regione *BRCA1/2*, sono consigliati 3 GB di dati di sequenziamento in totale. Se il criterio di qualità (3 GB) non è soddisfatto, ripetere il protocollo a partire dal passaggio di quantificazione della libreria.

Controllare le immagini delle celle a flusso Illumina seguendo le istruzioni del produttore.

- Se la libreria è sovraccarica (densità dei cluster satura), ridurre il numero di librerie in pool aggiunte alla cartuccia.
- Se la densità dei cluster è bassa, aumentare il numero di librerie in pool aggiunte alla cartuccia.

Bassa specificità del sequenziamento (% di letture allineate alla regione target *BRCA1/2*)

Controllare le dimensioni medie delle librerie dimensionate e purificate

Se il criterio di qualità della specificità (80%) non è soddisfatto, valutare la qualità della purificazione analizzando le dimensioni dei frammenti della libreria. La dimensione media di un amplicone è di 280 bp.

Riavviare il protocollo dalla T-PCR.

Commenti e suggerimenti

Bassa copertura delle letture

Controllare la copertura minima per amplicone

Se il criterio di qualità della copertura (200x) non è soddisfatto, si consiglia di:

- Verificare che le 4 reazioni PCR target siano state unite in pool con volumi equivalenti.
- Verificare l'omogeneità delle letture per quanto riguarda il numero delle letture ottenute per ciascuno dei 10 campioni più il controllo positivo.

Contaminazione del controllo senza template (NTC)

a) Controllare il controllo NTC dopo la T-PCR

Se viene rilevato un campione nel controllo NTC, potrebbe essersi verificata una contaminazione durante la T-PCR o durante i passaggi di creazione del pool di campioni e di purificazione.

Ripetere la T-PCR.

b) Controllare la concentrazione del controllo NTC dopo i passaggi di preparazione della libreria e dimensionamento

Se la concentrazione del controllo NTC è superiore a 1 nM, potrebbe essersi verificata una contaminazione durante i passaggi di preparazione della libreria, dimensionamento, amplificazione PCR o purificazione PCR.

Ripetere la T-PCR.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Il kit è destinato ad un uso professionale.

Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale preparato e addestrato in modo specifico all'uso delle tecnologie di biologia molecolare e con competenze specifiche su questa tecnologia.

Il kit deve essere utilizzato seguendo le istruzioni fornite nel presente manuale e in combinazione con uno strumento approvato (vedere elenco nella sezione "Materiale necessario ma non fornito: Analisi", pagina 7).

Prestare attenzione alle date di scadenza stampate sulle confezioni e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti.

È approvato l'uso del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA esclusivamente con tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina.

Per il sequenziamento della libreria di campioni è stato validato soltanto il sistema Illumina MiSeqDx.

Qualsiasi impiego non previsto del prodotto e/o qualsiasi alterazione dei relativi componenti esenteranno QIAGEN da qualsiasi responsabilità.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

La rilevazione delle mutazioni dipende dall'integrità del campione, dal contenuto tumorale e dal DNA amplificabile presente nel campione.

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA, insieme al flusso di lavoro di analisi, non è idoneo all'analisi della variazione del numero di copie (copy number variation, CNV).

Tutti i risultati diagnostici generati con il prodotto devono essere obbligatoriamente interpretati nel contesto delle altre rilevazioni cliniche o di laboratorio.

Caratteristiche prestazionali

IMPORTANTE: le caratteristiche prestazionali del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono state definite utilizzando lo strumento di reporting del software Biomedical Genomics Workbench con BRCA 1/2 CE-IVD Workflow. Prima di inserire il flusso di lavoro nel ciclo d'uso abituale del laboratorio dell'utente finale, sarebbe opportuno svolgere una verifica indipendente del flusso di lavoro nella sua interezza.

Intervallo di misurazione del test

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è progettato in modo da coprire tutte le regioni codificanti dei geni *BRCA1* e *BRCA2*, più almeno 20 bp fiancheggianti ogni esone codificante. Per le informazioni sulla copertura offerta dal kit fare riferimento alla Tabella 9.

Tabella 9. Informazioni sulla copertura

Copertura	N° di valori	FFPE	NA12878
		82 campioni	67 campioni
Copertura minima	Min	1863	813
	Mediana	5624	4725
	Media	5591	5187
	Max	11.890	14.187
	% di dati con copertura $\geq 200\times$	100%	100%
Copertura minima normalizzata* (equivalente a 3 GB di dati per seduta di sequenziamento)	Min	1142	539
	Mediana	3499	3124
	Media	3494	3416
	Max	7383	9211
	% di dati con copertura $\geq 200\times$	100%	100%

* La copertura di ampliconi per seduta di sequenziamento è stata normalizzata moltiplicando la copertura minima del kit per il rapporto: 3 GB (output di dati di sequenziamento minimo consigliato)/output di sequenziamento della seduta (in GB).

Uniformità dell'amplificazione

Dagli 82 set di dati di campioni FFPE, si evince che il 99,29% delle posizioni target è coperto da un numero di letture maggiore del 20% della profondità media di copertura (intervallo di previsione del 95% 96,81-100%).

Sostanze interferenti

Per definire il potenziale impatto sulle prestazioni del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA, sono stati eseguiti dei test sui reagenti del kit per l'estrazione del DNA da campioni FFPE e sulle potenziali sostanze interferenti nei campioni FFPE. Le condizioni/sostanze interferenti non hanno avuto nessun impatto sulle prestazioni relativamente alla quantificazione del DNA e della libreria, alla generazione dei dati di sequenziamento e all'identificazione delle varianti.

Carryover

La legatura di specifiche sequenze di oligonucleotidi viene utilizzata per generare i cluster Illumina e per identificare i campioni. Alternando l'uso di 2 set di 12 codici a barre tra sedute successive, è possibile ridurre il rischio di contaminazione.

In una seduta di sequenziamento (Seduta 1) sono stati utilizzati i campioni che avevano codici a barre presi dal primo set di adattatori. Sono state eseguite altre due sedute di sequenziamento (Seduta 2 e Seduta 3) senza campioni, durante le quali sono stati quantificati i codici a barre rimanenti dal primo set, così da misurare la contaminazione da carryover tra le sedute. Lo stesso esperimento è stato eseguito utilizzando un secondo set di codici a barre. La percentuale globale di contaminazione da carryover da seduta a seduta è stata calcolata confrontando il rapporto tra il numero di letture ottenute dalla Seduta 1 e dalla Seduta 3 con i due set di codici a barre, in quanto si presume che il cliente utilizzi alternativamente i due set di codici a barre disponibili.

Il carryover da seduta a seduta, in pratica la percentuale di letture dai campioni della Seduta 1 che vengono rilevate ancora nella Seduta 3 (senza campioni), è risultato essere dello 0,43% per il primo set di codici a barre e dello 0,47% per il secondo.

Letture "on-target" (specificità del test)

Per letture "on-target", o centrate, si intende la percentuale di letture allineate alla regione target tra le letture totali ottenute per un campione. Questa percentuale viene calcolata con una formula:

$$\text{Letture "on-target" (\%)} = \frac{\text{Numero di letture allineate alla regione target} \times 100}{\text{Numero totale di letture}}$$

Le statistiche delle letture "on-target" sono state ricavate da 82 set di dati, generati utilizzando 3 lotti del kit per analizzare 52 estratti di DNA ottenuti da campioni FFPE. Mediamente, il 94,51% delle letture erano allineate alla regione target (Tabella 10).

Tabella 10. Letture "on-target" (specificità del test)

Media	Min	Max	Deviazione standard
94,51%	87,67%	96,17%	1,4%

Precisione del test

La ripetibilità (precisione nella stessa seduta) e la riproducibilità (precisione tra sedute) del test sono state valutate dal punto di vista della frequenza allelica (allele frequency, AF). Sono stati miscelati due campioni per generare un numero massimo di varianti con una frequenza allelica attesa tra il 5 e il 15%. I campioni sono stati analizzati in duplicato nel corso di 6 sedute di sequenziamento eseguite su 2 piattaforme MiSeqDx (riproducibilità tra strumenti), da 3 operatori (riproducibilità tra operatori) e con 3 lotti del kit (variabilità tra lotti).

L'obiettivo era stabilire le percentuali relative della variabilità totale introdotta ad ogni livello: lotto, operatore, strumento, repliche. Dall'analisi dei componenti della varianza si osserva che il componente principale della varianza totale è la ripetibilità, così come emerge dai duplicati nella stessa seduta (vedere la Tabella 11, colonna Sr).

Tabella 11. Compilazione di tutte le varianti rilevate nei 36 set di dati per 2 campioni

Posizione variante e allele rif. > Allele variante	AF attesa	AF media calcolata (n=36)	DS*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Total*	Affidabilità†
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
S2/41244000 T>C	14,3	9,6	0,99	10,27	0,99	0,00	0,00	0,00	0,99	100,00

Posizione variante e allele rif. > Allele variante	AF attesa	AF media calcolata (n=36)	DS*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Stotal*	Affidabilità†
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
S2/32915411 32915414 AATT>-	9,2	9,7	0,76	7,83	0,70	0,00	0,26	0,26	0,79	78,35

Posizione variante e allele rif. > Allele variante	AF attesa	AF media calcolata (n=36)	DS*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Stotal*	Affidabilità†
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

* DS: deviazione standard; CV: coefficiente di variazione (Stotal/Media) Sr: ripetibilità DS (precisione nello stesso lotto); Si: DS tra lotti; So: DS tra operatori; Sin: DS tra strumenti; Stotal: DS totale (precisione nello stesso laboratorio).

† Affidabilità= (Sr²/Stotal²) × 100

Limite di sensibilità (LOD)

Valore limite del test

Il valore limite (cut-off) del test per quanto riguarda la frequenza allelica è la frequenza allelica minima alla quale il 99,9% delle varianti rilevate è costituito da varianti vere positive, dopo l'eliminazione delle varianti false positive descritte nelle Tabelle 13, 14 e 16. È stato calcolato un valore limite (cut-off) della frequenza allelica delle varianti (variant allele frequency, VAF) pari al 5,75% per i 53 campioni già caratterizzati: 13 campioni ottenuti dalla riserva del Coriell Institute for Medical Research e 20 campioni FFPE clinici analizzati in duplicato con 3 lotti del kit.

Per dimostrare che il test è in grado di rilevare una VAF dell'1,5%, 4 DNA ottenuti da campioni tumorali FFPE sono stati miscelati in proporzioni variabili con un altro DNA ottenuto da un campione tumorale FFPE. Per riprodurre il calo di omogeneità tra i campioni multiplex, le sedute di sequenziamento sono state eseguite con quantità decrescenti di materiale di libreria caricato sulla cartuccia, comprese tra una quantità massima di 4 nM (consigliata) e una quantità minima di 0,125 nM. La quantità totale del materiale di libreria è stata mantenuta a una concentrazione costante di 4 nM aumentando la quantità di DNA del controllo positivo NA12878.

La sensibilità del test è stata calcolata con l'analisi Probit e i risultati ottenuti sono indicati nella Tabella 12. Per una quantità iniziale di materiale di libreria di 4 nM, il test rileva le varianti a una VAF dell'1,54%.

Tabella 12. Sensibilità del test: VAF minima rilevata con quantità decrescenti di materiale di libreria

Quantità di materiale di libreria (campione)	LOD VAF
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%

Copertura minima per rilevare la VAF al 5,75%

È stata valutata la copertura minima (numero totale di letture) necessaria per confermare un valore cut-off della VAF pari al 5,75%. Sono stati utilizzati 4 DNA di campioni tumorali FFPE, miscelati in proporzioni variabili con un altro DNA di campione tumorale FFPE, in modo da ottenere valori VAF compresi tra il 5,25% e il 6,25%, con una mediana stimata della VAF del 5,75%. Sono state eseguite molteplici sedute di sequenziamento con diluizioni seriali doppie dello stesso set di campioni, miscelati con quantità di materiale di libreria comprese tra 4 nM e 0,015625 nM. Ad esempio, se si ottiene una copertura 15.000× con una quantità di materiale di libreria di 4 nM, la stessa variante sarà rilevata a una copertura 59× con 0,015625 nM.

Per determinare il limite LOD per ogni categoria di AF utilizzando un metodo conforme alle norme NCCLS EP17-A2 (20) è stata scelta l'analisi Probit. Il valore finale è la copertura necessaria per rilevare l'AF con una confidenza del 95%. Nella Figura 9 è riportato un grafico di esempio.

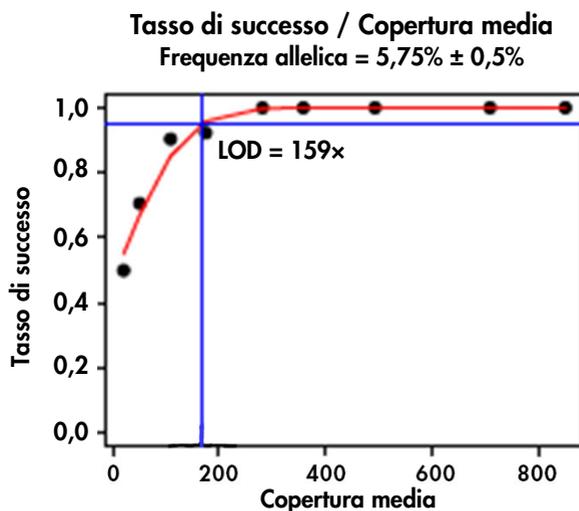


Figura 9. Analisi Probit. Il tasso di successo è la percentuale di varianti rilevate in base alla copertura.

Per rilevare la VAF al 5,75% occorre un numero minimo di 200 letture per posizione (il valore LOD era 159x, arrotondato per eccesso a 200x).

Accuratezza

L'accuratezza è stata stimata utilizzando campioni precedentemente caratterizzati, compresi campioni di DNA dalla riserva del Coriell Institute for Medical Research e DNA estratto da campioni tumorali ovarici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

- Set 1: 13 campioni dalla riserva Coriell completamente caratterizzati per la regione target (attese 191 varianti)
- Set 2: 27 campioni dalla riserva Coriell parzialmente caratterizzati per 25 varianti patogene (attese 27 varianti)
- Set 3: 20 campioni di DNA estratto da campioni FFPE di tumori ovarici completamente caratterizzati per la regione target (attese 570 varianti)

Tutte le varianti attese sono state rilevate nei campioni Coriell (Set 1 e Set 2), comprese due grandi delezioni di 40 nucleotidi in *BRCA1* (BRCA1: c.1175_1214del40 p.Leu392Glnfs).

L'accuratezza è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Accuratezza (\%)} = \frac{(\text{Numero di veri positivi} + \text{Numero di veri negativi}) \times 100}{\text{Regione target (21.150 basi)}}$$

L'accuratezza per i campioni FFPE (Set 3) è stata calcolata al 99,988% utilizzando un metodo Probit per impostare la soglia di frequenza allelica al 5,75%.

Limitazioni delle varianti

Varianti false positive

È stato compilato un elenco di 47 varianti false positive per un set di campioni precedentemente caratterizzati: 13 campioni dalla riserva Coriell e 20 campioni clinici FFPE analizzati in duplicato; n = 53. Le varianti false positive sono imputabili alle limitazioni dello strumento in relazione alle sequenze con tratti omopolimerici > 6 nt e/o a regioni con ripetizioni dinucleotidiche e trinucleotidiche. Le varianti false positive possono anche essere artefatti originati da dimeri primer.

L'elenco delle varianti false positive del gene *BRCA1* sul cromosoma 17 è riportato nella Tabella 13. L'elenco delle varianti false positive del gene *BRCA2* sul cromosoma 13 è riportato nella Tabella 14. La posizione del falso positivo (FP) è descritta nella prima colonna (coordinate Hg19) ed è seguita dai nucleotidi di riferimento (REF) e alternativo (ALT) individuati. La percentuale di set di dati in cui è stata individuata la variante FP (da 53 set di dati) è riportata nella colonna "% di set di dati (n = 53)". Le percentuali di frequenza allelica (AF) minima, media e massima nei 53 set di dati sono riportate nelle colonne "AF minima (%)", "AF media (%)" e "AF massima (%)". Le varianti sono classificate in 4 categorie: "Omopolare" (FP da tratti omopolimerici > 6 nt), "Dimero primer" (FP da artefatti di dimeri primer), "Tratto" (FP da ripetizioni dinucleotidiche e trinucleotidiche) e "Altro" (FP da errori nella sintesi della polimerasi e/o nel sequenziamento).

Tabella 13. Elenco di varianti false positive (FP) rilevate per il gene *BRCA1* sul cromosoma 17

Regione	RIF	ALT	Tipo	% di set di dati (n = 53)	AF minima (%)	AF media (%)	AF massima (%)	Classificazione dei falsi positivi
41231323	C	T	SNV	9,4	1,3	2,0	2,5	Altro
41231324	G	A	SNV	9,4	1,1	1,4	2,6	Altro
41231333	G	C	SNV	7,5	1,0	1,5	1,7	Tratto
41231352	T	C	SNV	9,4	1,4	1,8	2,1	Altro
41231370	C	A	SNV	5,7	1,1	1,2	1,3	Altro
41231401	C	T	SNV	1,9	1,4	1,4	1,4	Altro
41231404	T	C	SNV	11,3	1,2	2,4	3,8	Altro
41231419	G	A	SNV	9,4	1,3	2,5	3,4	Altro
41242939..41242940	CA	-	Delezione	100	3,1	4,8	6,1	Tratto
41243524	A	C	SNV	92,5	1,1	1,7	2,7	Dimero primer
41244613	G	A	SNV	3,8	2,0	2,1	2,1	Altro
41245586^41245587	-	T	Inserzione	96,2	1,1	1,4	2,4	Omopolare
41245587	T	-	Delezione	100	2,3	3,2	3,9	Omopolare
41246532	T	-	Delezione	13,2	1,0	1,1	1,2	Omopolare
41246926	A	-	Delezione	94,3	1,0	1,4	2,0	Omopolare
41267808	G	-	Delezione	77,4	1,0	1,2	1,5	Omopolare
41276152^41276153	-	AT	Inserzione	94,3	1,1	1,5	2,0	Tratto
41276153..41276154	AT	-	Delezione	100	1,9	2,7	3,3	Tratto

Tabella 14. Elenco di varianti false positive (FP) rilevate per il gene *BRCA2* sul cromosoma 13

Regione	RIF	ALT	Tipo	% di set di dati (n = 53)	AF minima (%)	AF media (%)	AF massima (%)	Classificazione dei falsi positivi
32893197^32893198	-	T	Inserzione	100	4,3	5,6	6,8	Omopolare
32893198	T	-	Delezione	100	11,0	12,6	13,5	Omopolare
32893198..32893199	TT	-	Delezione	5,7	1,1	1,2	1,3	Omopolare
32893318	G	A	SNV	3,8	1,3	1,8	2,2	Altro
32900364	T	-	Delezione	75,5	1,0	1,3	1,9	Omopolare

Regione	RIF	ALT	Tipo	% di set di dati (n = 53)	AF minima (%)	AF media (%)	AF massima (%)	Classificazione dei falsi positivi
32905197	T	-	Delezione	18,9	1,0	1,1	1,3	Omopolare
32905219^32905220	-	T	Inserzione	100	8,8	10,4	11,4	Omopolare
32905219^32905220	-	TT	Inserzione	96,2	1,0	1,2	1,6	Omopolare
32905220	T	-	Delezione	100	19,7	21,1	23,1	Omopolare
32905220..32905221	TT	-	Delezione	100	3,8	4,4	5,4	Omopolare
32907421	A	-	Delezione	94,3	2,2	3,1	3,9	Omopolare
32907535^32907536	-	T	Inserzione	100	6,8	7,7	10,0	Omopolare
32907535^32907536	-	TT	Inserzione	3,8	1,0	1,1	1,1	Omopolare
32907536	T	-	Delezione	100	21,4	23,8	26,3	Omopolare
32907536..32907537	TT	-	Delezione	100	3,6	4,6	6,2	Omopolare
32911074	A	-	Delezione	11,3	1,0	1,2	1,6	Omopolare
32911443	A	-	Delezione	9,4	1,0	1,1	1,2	Omopolare
32912346	A	-	Delezione	77,4	1,0	1,2	1,5	Omopolare
32913559	A	-	Delezione	100	1,0	1,5	2,0	Omopolare
32913837	A	-	Delezione	18,9	1,0	1,0	1,1	Omopolare
32914828	A	G	SNV	100	2,4	4,1	6,8	Dimero primer
32921032	C	T	SNV	3,8	1,4	1,4	1,4	Altro
32953633	A	-	Delezione	17,0	1,0	1,1	1,3	Omopolare
32954022^32954023	-	A	Inserzione	13,2	1,0	1,1	1,2	Omopolare
32954023	A	-	Delezione	100	2,1	3,3	4,1	Omopolare
32954303	T	-	Delezione	100	1,5	2,3	2,8	Omopolare
32968809	T	-	Delezione	96,2	2,3	2,6	3,2	Omopolare
32972287	T	-	Delezione	5,7	1,0	1,1	1,2	Omopolare
32972526	G	A	SNV	3,8	1,4	1,4	1,4	Altro

Varianti false negative

Le coppie di basi possono essere aggiunte (inserzioni) o rimosse (delezioni) dal DNA di un gene, in un numero variabile da uno a migliaia. Globalmente, queste mutazioni sono dette "indel". Le prestazioni del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono state definite sulla base della rilevazione di varianti di sostituzione e di indel corte (≤ 3 nt). Sono state identificate anche indel lunghe (> 3 nt), tuttavia non è stato possibile determinare le caratteristiche prestazionali della rilevazione di tali mutazioni.

Il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA, insieme al flusso di lavoro per l'analisi, non è idoneo per le analisi CNV (variazione del numero di copie).

I siti di legame ai primer del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA sono selezionati in modo da evitare la presenza di varianti entro le regioni esaminate. Ciò non esclude la presenza di varianti rare all'interno di un sito di legame al primer, circostanza che può determinare un'amplificazione non corretta e mascherare la presenza di possibili mutazioni clinicamente rilevanti. Se si sospetta questo fenomeno, si consiglia di eseguire un esperimento di conferma utilizzando un metodo alternativo.

Risultati della validazione

Lo studio di validazione del test del kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA è stato condotto su campioni FFPE di tessuto tumorale ovarico utilizzando 2 lotti di kit indipendenti. Lo studio ha valutato le prestazioni nelle normali condizioni d'impiego: volume iniziale di 40 ng, soglia di frequenza allelica delle varianti di 5,75% e copertura di 200x.

In totale sono stati forniti e caratterizzati 171 campioni FFPE di tessuto tumorale ovarico dai 3 laboratori che hanno collaborato: il Curie Institute in Francia, un laboratorio in Germania e uno nel Regno Unito. I laboratori avevano la libertà di adottare il metodo preferito per

L'identificazione delle varianti *BRCA1/2* e hanno utilizzato piattaforme, test, software e algoritmi diversi per la loro classificazione.

Per caratterizzare ulteriormente i campioni clinici, un laboratorio di sequenziamento esterno ha utilizzato il test Multiplicom BRCA Tumor MASTR™ Plus Dx per fornire i risultati impiegando una piattaforma bioanalitica indipendente.

I risultati ottenuti con tutti i metodi sono stati utilizzati per classificare le varianti come segue:

- Vera positiva (True Positive, TP): variante identificata sulla base dei dati del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA e rilevata almeno con un altro metodo
- Vera negativa (True Negative, TN): nessuna variante identificata nei risultati del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA e nei laboratori coinvolti
- Falsa positiva (False Positive, FP): variante identificata sulla base dei dati del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA ma non rilevata con gli altri metodi
- Falsa negativa (False Negative, FN): nessuna variante identificata sulla base dei dati del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA ma rilevata almeno con un altro metodo

Per calcolare il numero di varianti vera negativa, la regione target è stata definita come l'intersezione tra i 3 metodi che rappresenta 19.612 nucleotidi. Tre varianti univoche all'esterno di tale regione target sono state escluse dall'analisi.

Dopo questa classificazione, sono state osservate una variante falsa negativa e 4 varianti false positive tra le 2130 varianti ottenute con i 3 metodi. Il risultato discrepante per il gene *BRCA1* sul cromosoma 17 (falso negativo) è riportato nella Tabella 15. I risultati discrepanti per il gene *BRCA2* sul cromosoma 13 (falso positivo) sono riportati nella Tabella 16.

Tabella 15. Risultato discrepante secondo 3 metodi (tutte le varianti) per BRCA1 sul cromosoma 17

Posizione del genoma GRCh37	RIF*	ALT*	Tipo	VAF* del kit <i>therascreen</i> (%)	VAF attesa (%)	Rilevanza clinica	Classificazione della variante
41276067	29	-	Delezione	Non rilevata	71,11	Patogena	Falsa negativa

* RIF: nucleotide di riferimento; ALT: nucleotide alternativo; VAF: frequenza allelica delle varianti; SNV: variazione del singolo nucleotide.

Tabella 16. Risultati discrepanti secondo 3 metodi (tutte le varianti) per BRCA2 sul cromosoma 13

Posizione del genoma GRCh37	RIF*	ALT*	Tipo	VAF* del kit <i>therascreen</i> (%)	VAF attesa (%)	Rilevanza clinica	Classificazione della variante
32906729	A	C	SNV*	99,83	Non rilevata	Ignota	Falsa positiva
32912299	T	C	SNV	34,59	Non rilevata	Ignota	Falsa positiva
32912299	T	C	SNV	71,86	Non rilevata	Ignota	Falsa positiva
32913709	T	-	Delezione	43,18	Non rilevata	Patogena	Falsa positiva

* RIF: nucleotide di riferimento; ALT: nucleotide alternativo; VAF: frequenza allelica delle varianti; SNV: variazione del singolo nucleotide.

La variante falsa negativa, *BRCA1* g.41276067 c.19_47del29, era una grande delezione di 29 nucleotidi del gene *BRCA1* da un campione FFPE ovarico. In precedenza questa delezione era stata rilevata su un campione FFPE vescicale con il flusso di lavoro del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA.

Sono state rilevate tre varianti false positive a nucleotide singolo. Una era presente nella regione *BRCA2* g.32906729 e due nella regione *BRCA2* g.32912299. Il saggio Multiplicom ha presentato una copertura molto bassa in queste regioni, rispettivamente 28x, 38x e 0x. Un'analisi dei file di allineamento delle sequenze BAM ha dimostrato che le due varianti si sono manifestate alle frequenze alleliche corrispondenti: rispettivamente 28/28 (VAF 100%) e 9/38 (VAF 24%). Le discrepanze sono probabilmente dovute a una dispersione di ampliconi.

La variante falsa positiva *BRCA2* g.32913709delT è presente nel primo nucleotide dell'amplicone. Il corrispondente primer di amplificazione ibridizza su una sequenza contenente una variante patogena vera g.32913703 del TACT. Questa delezione è stata rilevata dal kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA e la sua presenza può spiegare il disallineamento del primer, che genera questa variante falsa positiva. Questo risultato falso positivo non determinerà mai un'errata classificazione del paziente, poiché è correlato sistematicamente alla rilevazione della vera variante patogena.

I risultati di questo studio sono riepilogati in una tabella di contingenza (Tabella 17), mentre nella Tabella 18 è riportata la valutazione complessiva di sensibilità e specificità.

- La sensibilità clinica è definita come concordanza positiva:
Vero positivo / (Vero positivo + Falso negativo)
- La specificità clinica è definita come concordanza negativa:
Vero negativo / (Falso positivo + Vero negativo)
- L'accuratezza è definita come concordanza complessiva tra i risultati del test e i risultati delle collaborazioni e del terzo metodo:
Vero positivo + Vero negativo / Numero di basi nella regione target

Tabella 17. Tabella di contingenza con prestazioni calcolate del kit *therascreen BRCA1/2* NGS FFPE gDNA

		Risultati ottenuti da collaborazione e test Multiplicom (metodo di riferimento)		
		Positivi	Negativi	Totale
Risultati del test del kit <i>therascreen BRCA1/2</i> NGS FFPE gDNA	Positivi	2125 Veri positivi	4 Falsi positivi	2129
	Negativi	1 Falso negativo	3.351.522 Veri negativi	3.351.523
Totale		2126	3.351.526	3.353.652

Tabella 18. Sensibilità, specificità e accuratezza tra i metodi

Parametro	Risultato	IC 95%
Sensibilità	99,9530%	99,7382-100%
Specificità	99,9999%	99,9997-100%
Accuratezza	99,9998%	99,9996-100%

Riferimenti bibliografici

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).

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Numero di catalogo
	Produttore
	Numero di materiale
Rn	“R” indica la revisione del manuale e “n” il numero della revisione
	Codice del lotto
	Global Trade Item Number
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Marchio CE per la Conformità Europea
	Utilizzare entro
 <N>	Contenuto sufficiente per N reazioni

Simbolo**Definizione del simbolo**



Limiti di temperatura

COMP

Componenti (ad esempio un elenco di tutto ciò che è incluso)

CONT

Contiene (contenuto)

NUM

Numero (ad esempio fiale, flaconi)



Attenzione



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Tenere al riparo dalla luce

Informazioni per gli ordini

Le informazioni necessarie per ordinare ulteriori prodotti e reagenti sono riportate nella Tabella 1 a pagina 15 della 1ª parte.

Prodotto	Indice generale	N° cat.
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit CE (20)	Per 20 reazioni: per l'identificazione delle varianti nei geni <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> con la piattaforma Illumina MiSeqDx; BRCA Primer Mix 1, BRCA Primer Mix 2, BRCA Primer Mix 3, BRCA Primer Mix 4, HotStarTaq DNA polimerasi, GR NGS Panel 5x PCR Buffer V2, acqua priva di nucleasi come controllo NTC	875011

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit QIAGEN possono essere scaricati dal sito www.qiagen.com o richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale.

Questo prodotto è destinato all'uso diagnostico in vitro. I prodotti QIAGEN non possono essere rivenduti, modificati per la rivendita o impiegati per la realizzazione di prodotti commerciali senza il consenso scritto di QIAGEN.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifiche senza preavviso. QIAGEN declina qualsiasi responsabilità per eventuali errori contenuti in questo documento. Questo documento è considerato completo e accurato al momento della pubblicazione. In nessun caso QIAGEN potrà essere ritenuta responsabile di danni accidentali, particolari, multipli o secondari in relazione all'impiego di questo documento o derivanti da quest'ultimo.

I prodotti QIAGEN sono garantiti conformi alle specifiche indicate. L'unico obbligo di QIAGEN – e l'unico rimedio a cui ha diritto il cliente – è la sostituzione gratuita dei prodotti in caso gli stessi non offrano le prestazioni richieste.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, *therascreen*® (Gruppo QIAGEN); 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® (Gruppo Khronos); SUSE® (SUSE PLC). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

Contratto di licenza limitata per il kit *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscono violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com

HB-2197-002 1103449 157014158 02/2017

© 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

