

Şubat 2017

therascreen[®] BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti El Kitabı Bölüm 2: Analiz

Sürüm 1

BRCA1 ve *BRCA2*'deki varyantların tanımlanması için

IVD

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

Illumina[®] MiSeqDx[™] platformuyla kullanım için

CE

REF

875011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALMANYA

R2 **MAT**

1103449TR

İçindekiler: Bölüm 2

Kullanım Amacı	4
Uyarı.....	4
Prosedür Prensipleri.....	5
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler: Analiz.....	7
Sıralama ekipmanı.....	7
Sıralama analizi için yazılım	7
CLC bio tarafından önerilen sistem gereklilikleri	7
Okuma eşleme için özel gereklilikler.....	8
3D Molecule Viewer için özel gereklilikler.....	9
Sistem gereklilikleri.....	9
Sistem önerileri.....	9
Uyarılar ve Önlemler.....	9
Genel önlemler.....	10
Prosedür: Bölüm 2.....	12
İş akışına genel bakış.....	12
Protokol: Veri analizi	13
Analiz iş akışının kurulumu	13
Analiz eklentisinin kurulumu	18
MiSeq cihazından Illumina FASTQ dosyalarını dışa aktarma.....	20
Illumina FASTQ dosyalarını içe aktarma	21
Sıralama analizi	26
Sonuçların Yorumlanması	41

VCF dosyasını dışa aktarma	42
Sorun Giderme Kılavuzu	44
Kalite Kontrol	48
Sınırlamalar	48
Performans Özellikleri	50
Testin bildirilebilir aralığı.....	50
Amplifikasyon homojenliği.....	51
Engelleyici maddeler	51
Taşıma	51
İsabetli okumalar (test özgüllüğü).....	52
Test hassasiyeti	52
Tespit Sınırı (LOD).....	56
Test eşiği	56
%5,75 düzeyinde VAF saptamak için minimum kapsama	57
Doğruluk.....	58
Varyant kısıtlamaları	59
Yanlış pozitif varyantlar	59
Yanlış negatif varyantlar	62
Doğrulama sonuçları	62
Referanslar.....	66
Semboller	69
Sipariş Bilgileri.....	71

Kullanım Amacı

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit (yeni nesil sıralama) paneli formalinde fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) yumurtalık tümör dokusundan türetilen DNA'da *BRCA1* ve *BRCA2* insan genlerinin kodlama bölgelerindeki varyantların tanımlanması amacıyla kullanılan moleküler tanılayıcı bir testtir. *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit paneli yumurtalık kanserlerinin sınıflandırılmasına yardımcı olması amacıyla kullanılır.

Uyarı

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin, Illumina MiSeqDx platformu ve Biomedical Genomics Workbench yazılımı (özel bir analiz iş akışı dahil) ile birlikte kullanımı onaylanmıştır.

ÖNEMLİ: Bu el kitabı iki bölüm olarak tedarik edilmiştir. Bölüm 1, özet ve açıklama, prosedür ilkeleri ve yaş kimya analiz laboratuvarı iş akışının açıklamasını içerir:

- Genomik DNA ekstraksiyonu
- Hedef PCR amplifikasyonu
- Örnek havuzlama ve saflaştırma
- Kütüphane oluşturma
- Adaptör bağlı DNA temizleme
- Hassas boyut seçimi
- Saflaştırılmış kütüphanenin PCR amplifikasyonu
- Kütüphane temizleme, miktar tayini ve havuzlama
- Havuzlanmış kütüphanelerin sıralama için hazırlanması
- Sıralama çalışmasının kurulumu ve başlatılması
- Sorun giderme kılavuzu

Bölüm 2 veri analizi ve kit performansı hakkında bilgiler içerir:

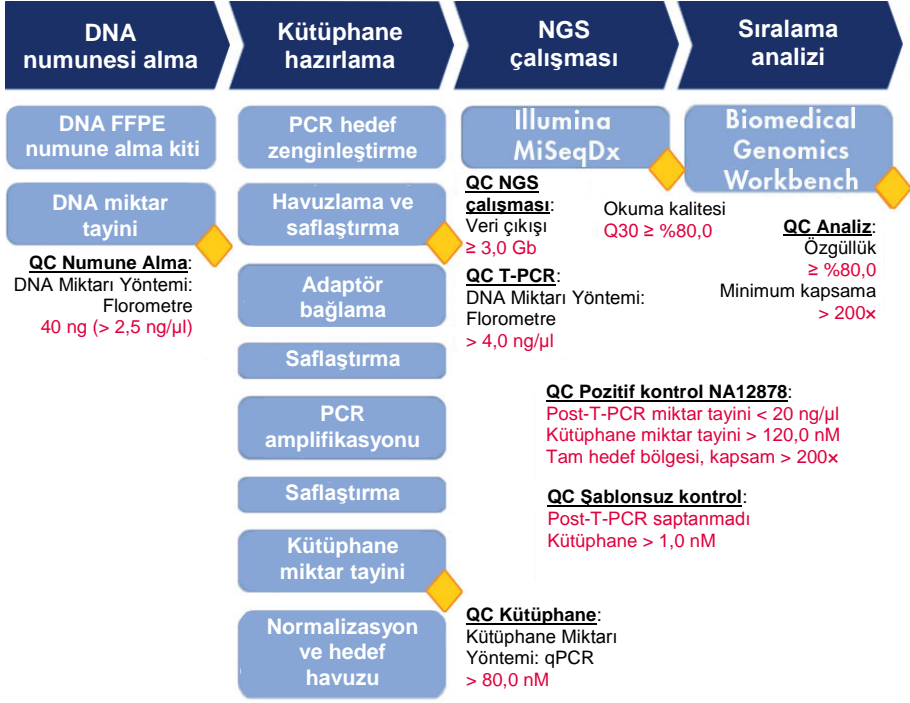
- Veri analizi
 - Analiz iş akışının kurulumu
 - Analiz eklentisinin kurulumu
 - MiSeqDx'den Illumina FASTQ dosyalarını dışa aktarma
 - Illumina FASTQ dosyalarını içe aktarma
 - Sıralama analizi
- Sonuçların yorumlanması
- Sorun giderme kılavuzu
- Performans özellikleri

ÖNEMLİ: İş akışı, bu el kitabında Bölüm 1 ve Bölüm 2'de anlatılan performansı sağlamak için tasarlanmış ve optimize edilmiştir. Kullanım talimatlarına harfiyen uyulmalıdır. Bu el kitabında Bölüm 1 ve Bölüm 2'de bulunan talimatlardan her tür sapma QIAGEN'in sorumluluğunu geçersiz kılacaktır. İş akışının tümü rutin kullanıma sokulmadan önce son kullanıcı laboratuvar tarafından bağımsız doğrulamaya tabi tutulmalıdır.

Prosedür Prensipleri

Sıralama Illumina üreticisinin protokolüne uyarak gerçekleştirilir. FASTQ dosyaları BRCA1/2 CE-IVD Workflow kullanılarak Biomedical Genomics Cancer Research Workbench yazılımında işlenir. Her örnek için bir varyant çağırma format dosyası oluşturulur ve varyant değerlendirmesi için Biomedical Genomics Cancer Workbench yazılımı önerilir.

Sonuçların iyi kalitede olmasını sağlamak için kütüphane hazırlama ve sıralama çalışmasının farklı adımlarında işlem içi kalite kontrol kriterleri kullanılır (Şekil 7). Bu kriterler kötü sıralama sonuçları veren örnekleri tanımlamak veya olası kontaminasyonu göstermek için iş akışının farklı adımlarının doğrulanmasına olanak tanır.



Şekil 7. Süreç içi kontrol kriterleri. T-PCR'ı, kütüphane hazırlamayı ve sıralama çalışmasını doğrulamak için sıralama iş akışı aracılığıyla (mavi kutular) pek çok işlem içi kontrol adımı gerçekleştirilir (sarı baklavalılar). Belli bir konumda iyi kalitede varyant çağırma sağlamak için kullanılan son kriter elde edilen minimum kapsamadır. Özgüllük, hedef bölgeye hizalanmış çift okumalarının yüzdesiyle ilgilidir.

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler: Analiz

Bu prosedürde kullanılan cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

Sıralama ekipmanı

- Illumina MiSeqDx (Illumina, Inc.; kat. no. DX-410-1001)
- Illumina MiSeq yazılımı, sürüm 2.5.0.5 veya üstü
- Illumina Experiment Manager yazılımı, sürüm 1.9 veya üstü

Sıralama analizi için yazılım

- Biomedical Genomics Workbench sürüm 2.1.1, CLC bio'dan (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2 , CLC bio'dan Biomedical Genomics Extension ile
- QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin
QIAGEN internet sitesinde *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ürün sayfasının **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesinden indirilebilir.
- BRCA 1/2 CE-IVD Workflow
QIAGEN internet sitesinde *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ürün sayfasının **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesinden indirilebilir.

CLC bio tarafından önerilen sistem gereklilikleri

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

- Windows Vista®, Windows® 7, Windows 8, Windows 10, Windows Server 2008 veya Windows Server 2012
Mac OS® 10.7 veya sonrası
Linux: Red Hat® 5.0 veya sonrası; SUSE® 10.2 veya sonrası; Fedora® 6 veya sonrası

- 8 GB RAM gerekli; 16 GB RAM önerilir
- 1024 x 768 ekran gerekli; 1600 x 1200 ekran önerilir
- Intel® veya AMD® CPU gerekli
- Varsayılan işletim sistemi kullanıcı geçici dizininde en az 100 GB boş disk alanı
- CLC_References dizininde (bir sunucuya bağlı değilseniz) en az 90 GB boş disk alanı gerekli

Daha az disk alanı mevcutsa referans veri konumu değiştirilebilir. Bkz.

resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/biomedicalgenomicsworkbench/application/current/. Getting started (Başlarken) bölümünü genişletip **Reference data** (Referans verileri) ögesini açın ve **Download and configure reference data** (Referans verilerini indir ve yapılandır) ögesine tıklayın.

Okuma eşleme için özel gereklilikler

Aşağıdaki sayılar eşleme ve analiz görevleri çalıştıran sistemler için minimum ve önerilen bellek miktarını belirtir. Önerilen gereklilikler genom boyutuna göre değişir.

- İnsan (3,2 Gb) ve fare (2,7 Gb)
 - Minimum: 6 GB RAM; önerilen: 8 GB RAM

Belirtilenden daha az belleğe sahip sistemlerde eski okuma eşleyici eklentisinin kurulması yararlı olacaktır (bkz. www.clcbio.com/clc-plugin/read-mapper-legacy-version). Bu, standart eşleyiciden daha yavaştır ancak mevcut bellek miktarına göre kendini ayarlar.

3D Molecule Viewer için özel gereklilikler

Sistem gereklilikleri

- OpenGL® 2.0'ı destekleyebilen bir ekran kartı
- Güncellenmiş grafik sürücüler

Ekran kartı için en son sürücünün kurulu olduğundan lütfen emin olun.

Sistem önerileri

- NVIDIA® veya AMD/ATI™'den ayrı bir ekran kartı

Modern bütünleşik ekran kartları (Intel HD Graphics serisi gibi) da kullanılabilir ancak bunlar genelde ayrı kartlardan daha yavaştır.

- Büyük yapılarla çalışmak için 64-bit workbench sürümü önerilir

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bu belgeler, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak PDF biçiminde mevcuttur.

Genel önlemler

NGS testlerinin kullanımı kullanılan tüm ekipmanların bakımı ve kalibrasyonu ve geçerli yönetmeliklere ve ilgili standartlara uygunluk dahil olmak üzere iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

- Örneği ve test atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinde tedarik edilen reaktifler optimal olarak seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için, reaktifleri daha fazla seyreltmeyin.
- *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitindeki tüm reaktifler, yalnızca aynı kitte verilen reaktiflerle birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Performansı etkileyebileceği için *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA kitleri arasında hiçbir reaktifi birbiri yerine kullanmayın.
- *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin ve gerekli olan ancak tedarik edilmemiş kitlerin son kullanma tarihi geçmiş veya yanlış taşınmış ve saklanmış bileşenlerini kullanmayın. Kullanmadan önce daima kontrol edin.
- İnkübasyon sürelerinin ve/veya sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
- Doğru örnek testi yapabilmek için hatalı örnek girişi, yükleme hatası, pipetleme hatası ve barkodlama hatası gibi durumlara karşı dikkatli olunmalıdır.
- İzlenebilirliği sağlamak amacıyla sürekli doğru tanımlamayı garanti etmek için örneklerin sistematik bir şekilde kullanıldığından emin olun.
- Çapraz kontaminasyonu engellemek için çok dikkat edin.
- Yanlış pozitif sinyale neden olabilecek PCR ürünü aktarma kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
- DNA şablonlarının bozulmasına yol açabilen DNase kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.

-
- Nükleaz içermeyen laboratuvar ekipmanı kullanın (ör. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri). Örneklerin ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için tüm pipetleme adımları için yeni aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
 - Ön-PCR ana karışımını hiçbir DNA matrisinin (cDNA, plazmid veya PCR ürünleri) içeri sokulmadığı ayrılmış bir alanda özel malzemeler (pipetler, uçlar vb.) kullanarak hazırlayın. Kalıbı ayrı bir bölgede (tercihen farklı bir odada) özel malzemeler (pipetler, uçlar vb.) kullanarak ekleyin.
 - İlave uyarılar, önlemler ve prosedürler için Illumina MiSeqDx cihazı kullanım kılavuzuna başvurun. NGS platformunun güç kaynağı sağlaması ve bir kez başlatıldığında kullanıcının hiçbir etkileşimi olmamasını sağlaması için doğru kurulması gereklidir.
 - İşlem bitmeden Illumina MiSeqDx cihazını açmayın.

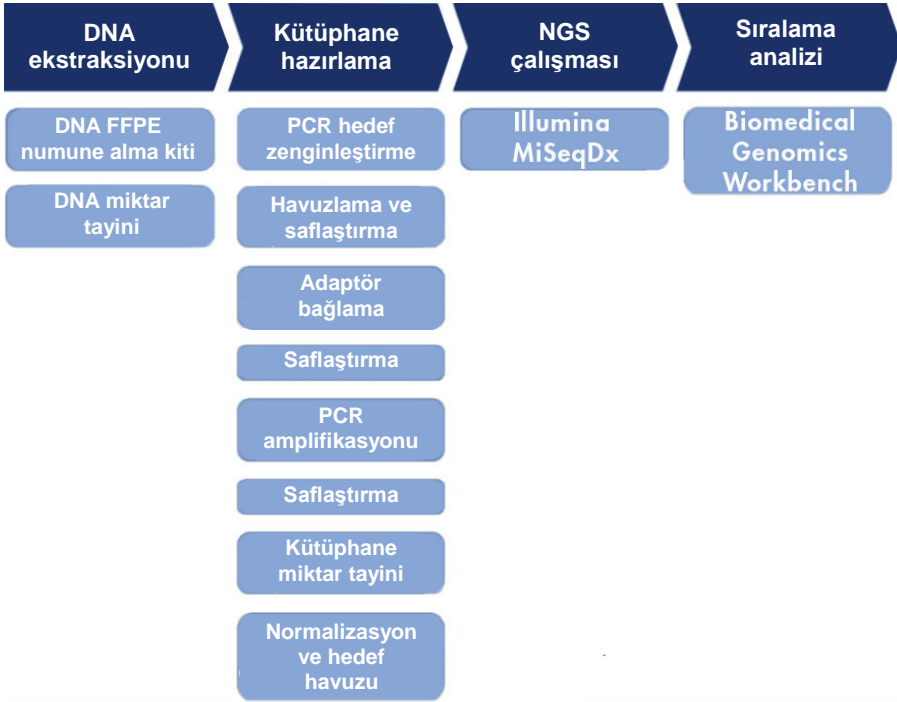
Prosedür: Bölüm 2

İş akışına genel bakış

İş akışının aşağıdaki şemada anlatılan kısımları tedarik edilmeyen kit ve reaktifleri içeren adımlar dahil bu prosedür için optimize edilmiştir.



Lütfen aşağıdaki prosedürü dikkatle okuyun ve talimatlar için sadece bu el kitabında Bölüm 1 ve Bölüm 2'ye bakın.



Şekil 8. NGS iş akışına genel bakış.

Protokol: Veri analizi

Bu bölüm yazılım kurulumunun ve sıralama sırasında oluşturulan FASTQ dosyalarının analizinin bir açıklamasını içerir.

Veri analizi için gerekli ürünler ve yazılım:

- Biomedical Genomics Workbench yazılımı sürüm 2.1.1 (www.clcbio.com)
- CLC Genomics Server 7.0.2, Biomedical Genomics Extension ile (www.clcbio.com)
- FASTQ dosyaları (eşleştirilmiş okumalar için her örnek için iki FASTQ dosyası beklenir)

Sıralama analizini gerçekleştirmek için özel test analiz iş akışını uygulamak önemlidir. Kullanıcının CLC yazılım analizini “yönetici” olmayan bir kullanıcı hesabından gerçekleştirmesi beklenir.

Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kurulu değilse, test analizi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow sıralama analizi öncesinde kurulmalıdır. İndirilebilir bir sürüm QIAGEN internet sitesinde *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ürün sayfasının **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesinde mevcuttur.
- Kurulu değilse, QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin sıralama analizi öncesinde kurulmalıdır.

Analiz iş akışının kurulumu

Analiz iş akışı kurulumu için iki seçenek mevcuttur:

- Yerel kurulum (“İş akışı: yerel kurulum işlemi”ni uygulayın)
- CLC Genomics Server'a kurulum (“İş akışı: yerel kurulum işlemi”ni atlayıp “İş akışı: sunucu kurulumu işlemi”ni uygulayın)

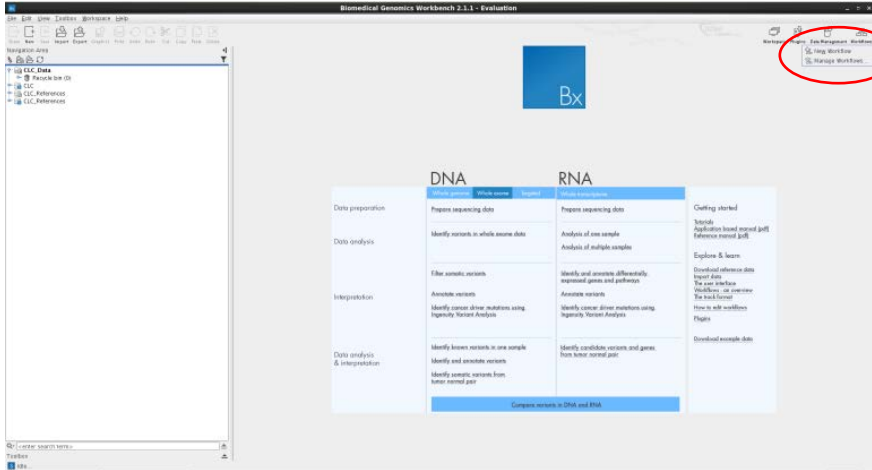
Test analizi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow zaten kuruluysa, “İş akışı: yerel kurulum işlemi” ve “İş akışı: sunucu kurulumu işlemi”ni atlayın.

İş akışı: yerel kurulum işlemi

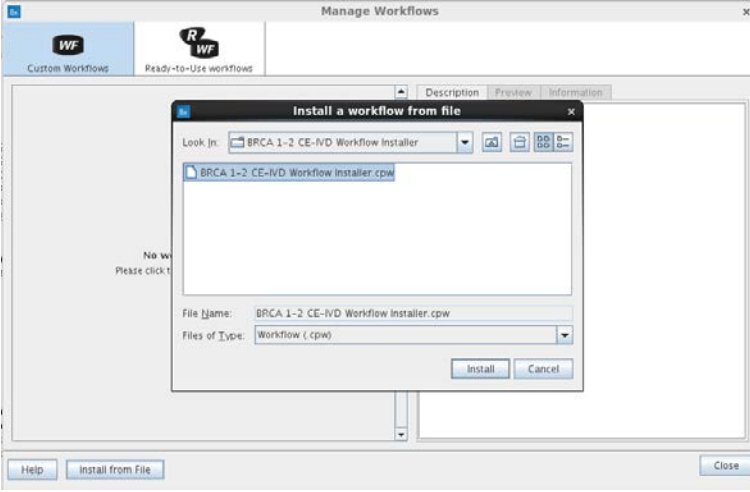
Bu kurulum işlemi test analizi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow'u Biomedical Genomics Workbench yazılımının kurulu olduğu yerel bilgisayarınıza kuracaktır.

Prosedür

1. **Biomedical Genomics Workbench** yazılımını başlatın.
2. **Workflows** (İş Akışları) öğesine, ardından da **Manage Workflows** (İş Akışlarını Yönet) öğesine tıklayın.

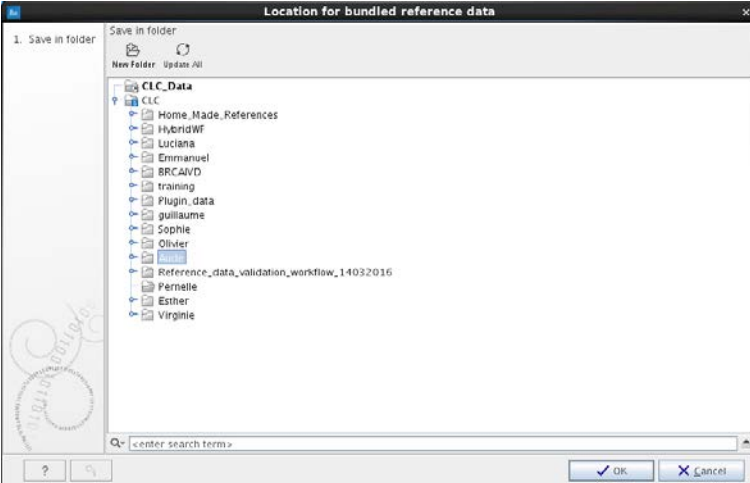


3. **Install from File** (Dosyadan Kur) ögesine tıklayın.

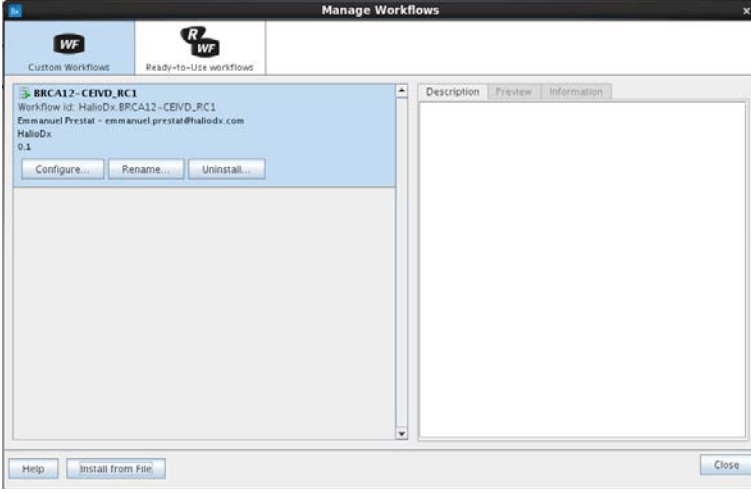


4. İş akışı dosyasını seçin: **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw**. **Install** (Kur) ögesine tıklayın.

5. Bir klasör oluşturup seçin ve ardından **OK** (Tamam) ögesine tıklayın.



6. **Close** (Kapat) ögesine tıklayın.



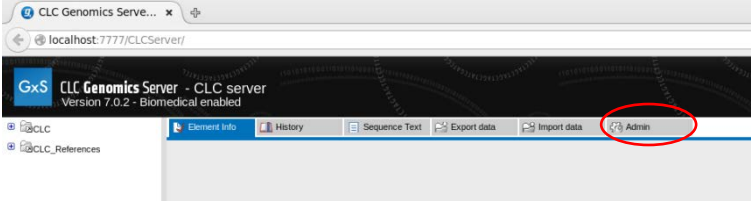
İş akışı: sunucu kurulumu işlemi

Bu kurulum işlemi test analizi BRCA 1/2 CE-IVD Workflow'u CLC Genomics Server (Biomedical etkinleştirilmiş) üzerine kuracaktır. Aşağıdaki prosedürde “serverIP”yi sunucu IP adresi için kullanıyoruz ve CLC Genomics Server bağlantı noktasının “7777” olduğunu (varsayılan) varsayıyoruz.

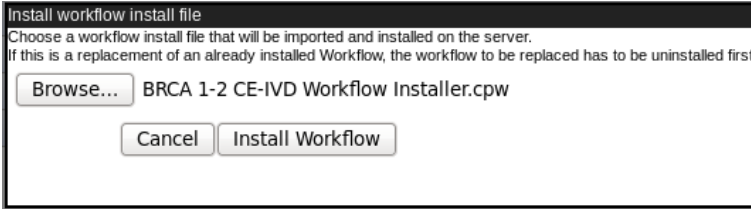
Prosedür

1. Bir internet tarayıcı kullanarak **http://serverIP:7777/** adresine bağlanın.
“serverIP”yi sunucunun IP adresiyle değiştirin veya internet tarayıcı doğrudan sunucu üzerinden çalıştırılmışsa “localhost” kullanın.
2. CLC yönetici kimlik bilgilerini girin (varsayılan olarak kullanıcı adı “root” ve parola “default” şeklindedir).

3. **Admin (Yönetici)** sekmesine tıklayın.



4. **Workflows (İş Akışları)** öğesini açıp **Install Workflow (İş Akışını Kur)** öğesine tıklayın.



5. İş akışı dosyası **BRCA 1-2 CE-IVD Workflow Installer.cpw**'yi seçip **Install Workflow (İş Akışını Kur)** öğesine tıklayın.

Not: BRCA 1/2 CE-IVD Workflow kurulumu tamamlandığında MiSeq cihazından FASTQ dosyalarını içe aktarmadan önce Biomedical Genomics Workbench yazılımı yeniden başlatılmalıdır.

Analiz eklentisinin kurulumu

Analiz eklentisinin kurulumu için iki seçenek mevcuttur:

- Yerel kurulum (“Eklenti: yerel kurulum işlemi”ni uygulayın)
- CLC Genomics Server'a kurulum (“Eklenti: yerel kurulum işlemi”ni atlayıp “Eklenti: sunucu kurulumu işlemi”ni uygulayın)

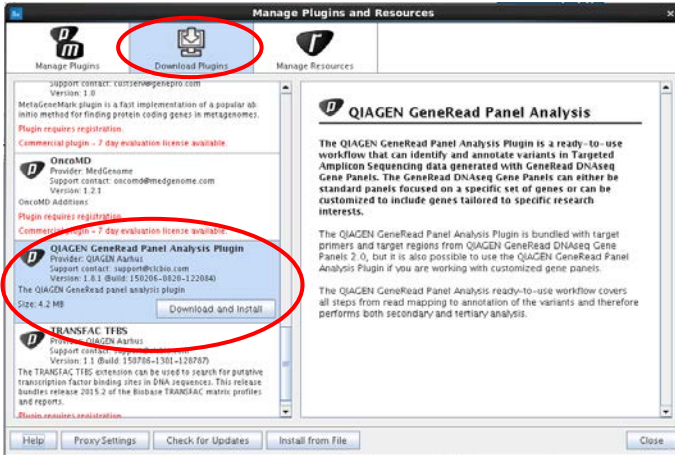
Test analizi eklentisi zaten kuruluysa, “Eklenti: yerel kurulum işlemi” ve “Eklenti: sunucu kurulumu işlemi”ni atlayın.

Eklenti: yerel kurulum işlemi

Bu kurulum işlemi QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin'i CLC Biomedical Genomics Workbench'in kurulu olduğu yerel bilgisayarınıza kuracaktır.

Prosedür

1. Biomedical Genomics Workbench yazılımını başlatın.
2. **Plugins** (Eklentiler) ögesine tıklayıp ardından **Download Plugins** (Eklentileri İndir) ögesini seçin.



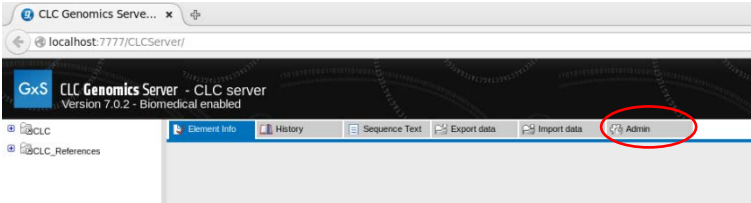
3. QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin'i seçip ardından **Download and Install** (İndir ve Kur) ögesine tıklayın.

Eklenti: sunucu kurulumu işlemi

Bu kurulum işlemi QIAGEN GeneRead Panel Analysis Plugin'i CLC Genomics Server (Biomedical etkinleştirilmiş) üzerine kuracaktır. Aşağıdaki prosedürde "serverIP"yi sunucu IP adresi için kullanıyoruz ve CLC Genomics Server bağlantı noktasının "7777" olduğunu (varsayılan) varsayıyoruz.

Prosedür

1. Bir internet tarayıcı kullanarak **http://serverIP:7777/** adresine bağlanın. "serverIP"yi sunucunun IP adresiyle değiştirin veya internet tarayıcı doğrudan sunucu üzerinden çalıştırılmışsa "localhost" kullanın.
2. CLC yönetici kimlik bilgilerini girin (varsayılan olarak kullanıcı adı "root" ve parola "default" şeklindedir).
3. **Admin** (Yönetici) sekmesine tıklayın.



4. **Plugins** (Eklentiler) ögesini açın.



5. **Install new plugin** (Yeni eklenti kur) paneline gidip **Browse...** (Göz at...) ögesinden dosya konumunu seçin.



GeneRead Panel Analysis Server Plugin'in indirilebilir sürümünü (QIAGEN internet sitesinde *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit ürün sayfasının **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesinde bulunur) kurun.

MiSeq cihazından Illumina FASTQ dosyalarını dışa aktarma

MiSeq bilgisayarında depolanan FASTQ dosyalarına Biomedical Genomics Workbench yazılımından ulaşılabilmesi için bunların MiSeq cihazından seçtiğiniz hedefe (harici sürücü veya sunucu) aktarılması gerekir.

Not: FASTQ dosyaları aşağıdaki sıralama çalışması klasöründedir:

MiSeqAnalysis\RunID\Data\Intensities\BaseCalls.

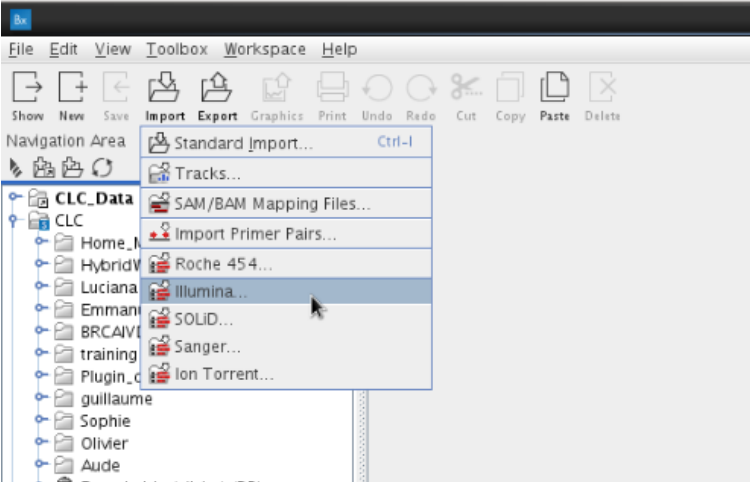
Ardışık çalışmalar arasında karışıklık olmasını engellemek ve yeterli disk alanını korumak için sonuçlar dosyasının NGS platformunda uzun dönem depolanmamasını öneririz.

Illumina FASTQ dosyalarını içe aktarma

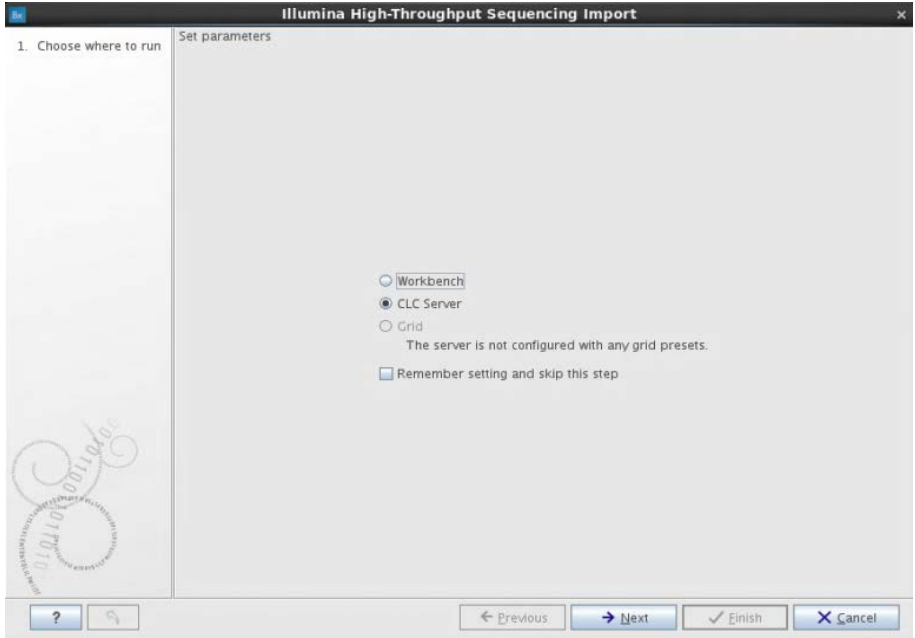
Örnek başına iki Illumina FASTQ dosyası bulunur.

Prosedür

1. Biomedical Genomics Workbench yazılımını açın.
2. **Import** (İçe Aktar) öğesine tıklayıp menüde **Illumina**'yı seçin.

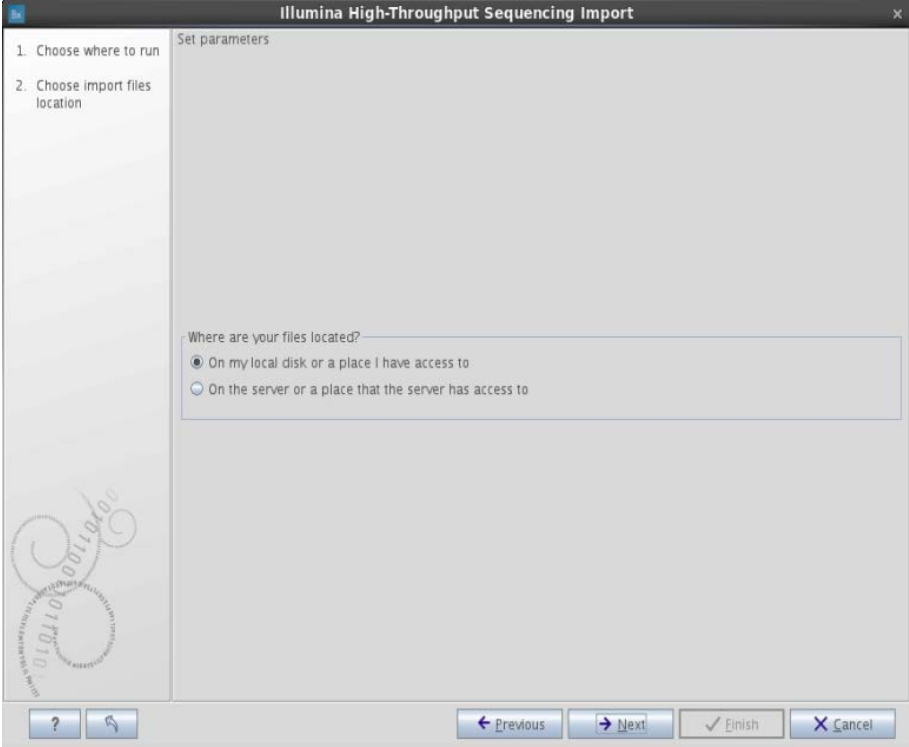


3. Uygun seçeneği işaretleyerek nerede çalıştırılacağını seçin.
 - BRCA 1/2 CE-IVD Workflow yerel olarak kurulduysa (yani, "İş Akışı: yerel kurulum işlemi" kullanılarak kurulduysa) Workbench (İş İstasyonu) öğesini seçin.
 - BRCA 1/2 CE-IVD Workflow sunucu seviyesinde kurulduysa (yani, "İş Akışı: sunucu kurulumu işlemi" kullanılarak kurulduysa) CLC Server (CLC Sunucusu) öğesini seçin.



4. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.

5. Önceki adımda **CLC Server** (CLC Sunucusu) öğesi seçildiyse aşağıdaki pencere açılacaktır.



6. **On my local disk or a place I have access to** (Yerel sürücümde veya erişimim olan bir yerde) öğesini seçip **Next** (İleri) öğesine tıklayın.

7. Analiz edilecek tüm FASTQ dosyalarını aşağıda MiSeq dosyası içindeki dizinden seçin:
Analysis/Data/Intensities/BaseCalls.

1. Choose where to run

2. Choose import files location

3. Import files and options

Set parameters

Look In: BaseCalls

File Name:

Files of type: Illumina files (.txt/ .fastq/ .fq/ .qseq)

General options

Paired reads

Discard read names

Discard quality scores

! Please select a file

Paired read information

Paired-end (forward-reverse) Mate-pair (reverse-forward)

Minimum distance 40 Maximum distance 400

Illumina options

Remove failed reads

MiSeq de-multiplexing

Trim reads

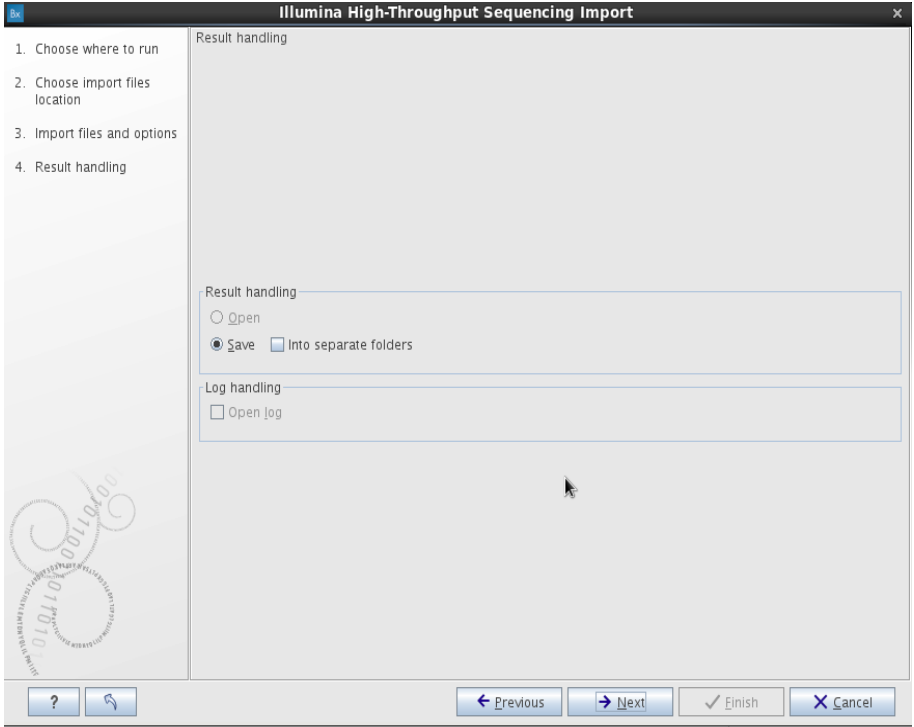
Quality scores: NCBI/Sanger or Illumina Pipeline 1.8 and later

Previous Next Finish Cancel

8. Aşağıdaki ayarları seçin:

- **Paired reads** (Eşleştirilmiş okumalar) ögesini işaretleyin
 - **Paired-end (forward-reverse)** (Eşleştirilmiş uç (ileri-geri)) ögesini seçin
 - **Minimum distance** (Minimum mesafe) alanına 40 ve **Maximum distance** (Maksimum mesafe) alanına 400 yazın
 - **Remove failed reads** (Başarısız okumaları çıkar) ögesini işaretleyin
9. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.

10. Aşağıdaki pencere açılacaktır. **Save** (Kaydet) seçimini yapın ve **Next** (Sonraki) düğmesine tıklayın.



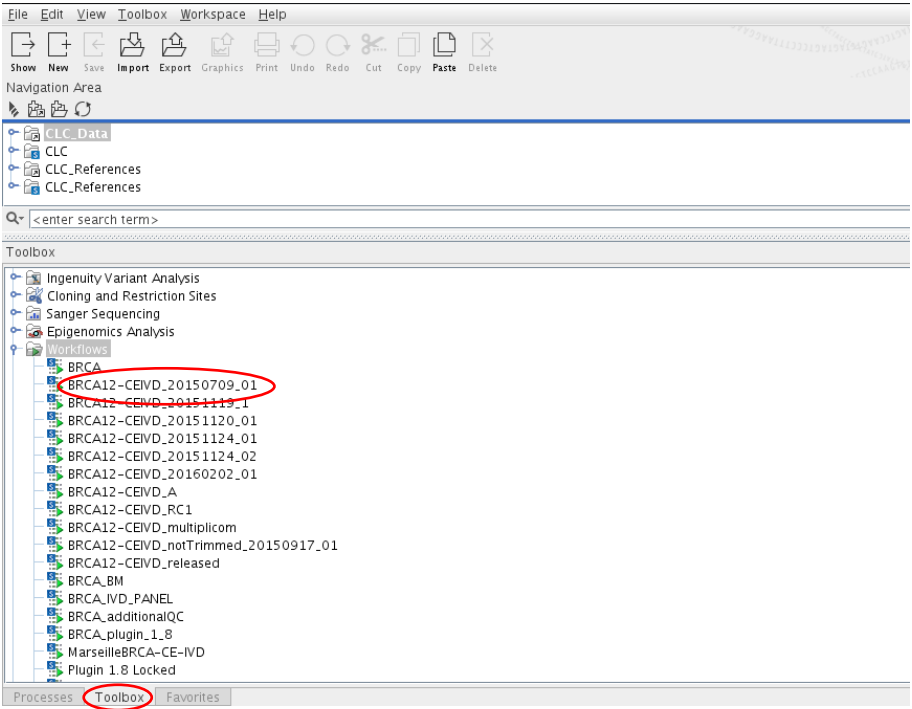
11. Eşleştirilmiş FASTQ dosyalarını saklamak için bir klasör oluşturun ve **Finish** (Bitir) ögesine tıklayın.

Sıralama analizi

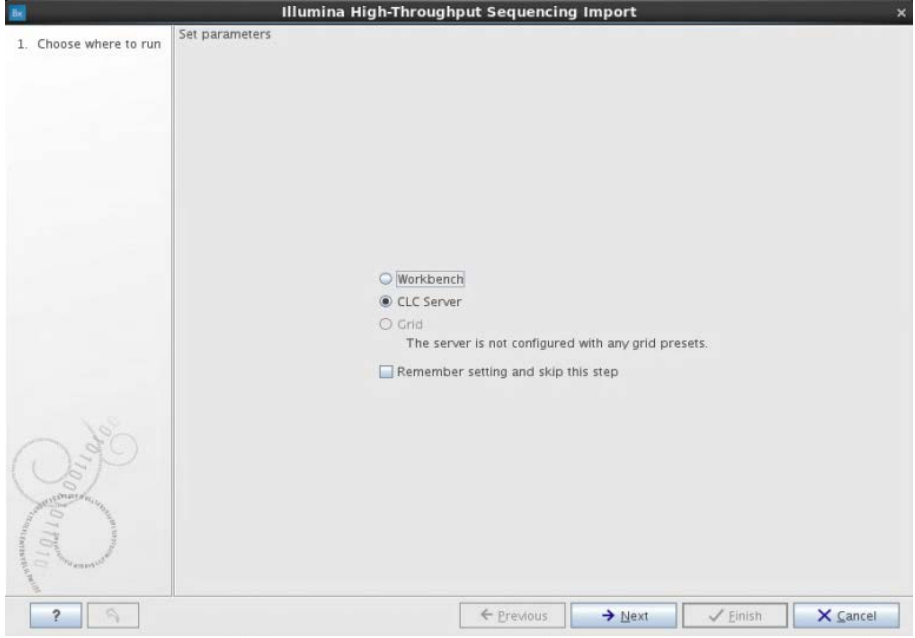
“İş akışı: yerel kurulum işlemi” veya “İş akışı: sunucu kurulumu işlemi” kullanılarak kurulmuş BRCA 1/2 CE-IVD Workflow test analizli FASTQ dosyalarını işleyin. Eşleştirilmiş FASTQ analizi için aşağıda açıklanmış adım adım prosedürü uygulayın.

Prosedür

1. **Toolbox** (Araç kutusu) sekmesini seçip iş akışı adına çift tıklayın.



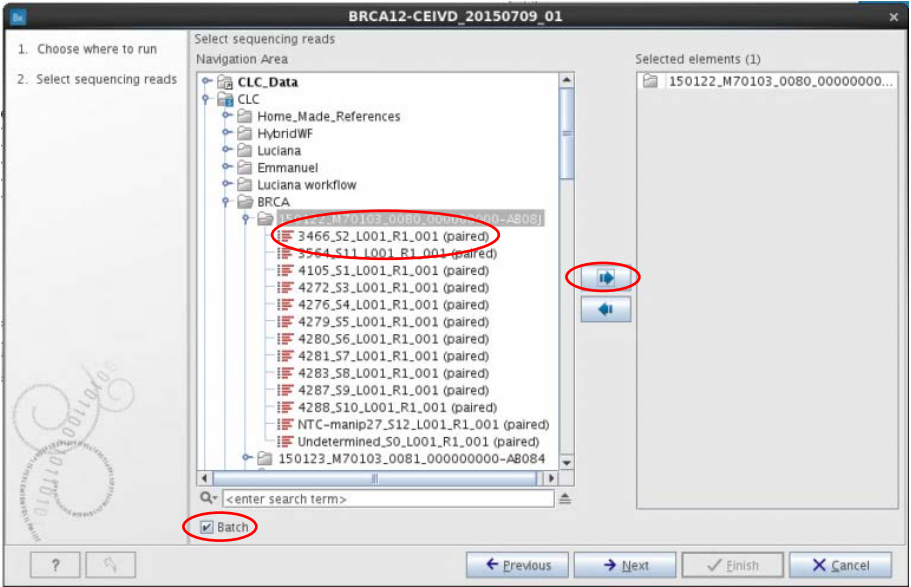
Aşağıdaki pencere açılır.




2. Geçerli seçeneği işaretleyin:

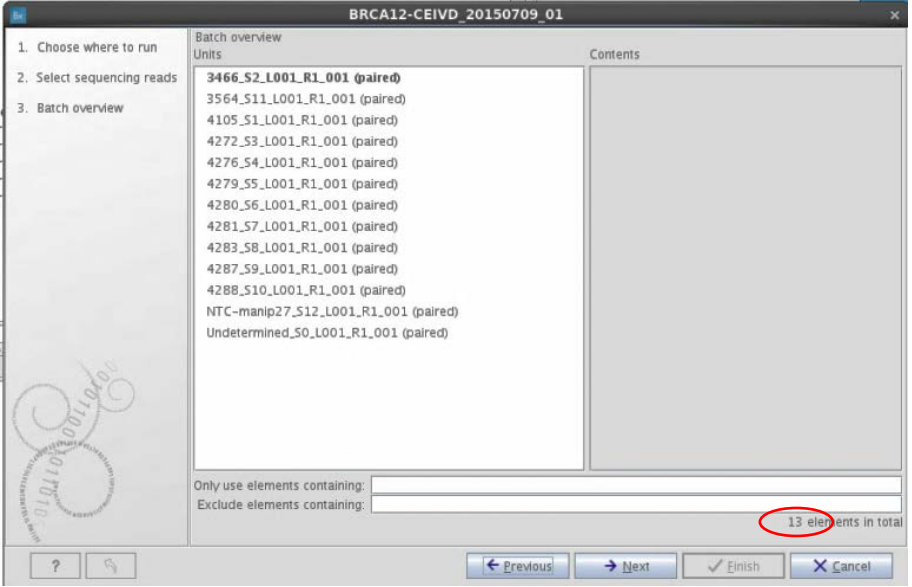
- BRCA 1/2 CE-IVD Workflow yerel olarak kuruluysa **Workbench** (İş İstasyonu) ögesini seçin.
- BRCA 1/2 CE-IVD Workflow sunucu seviyesinde kuruluysa **CLC Server** (CLC Sunucusu) ögesini seçin.

3. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.



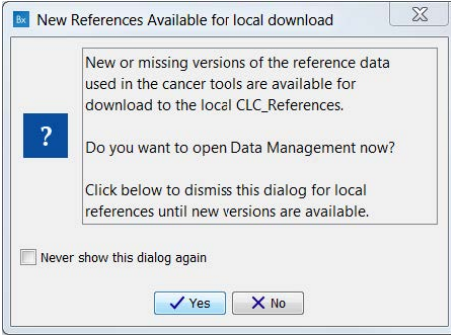
4. FASTQ dosyalarını içeren klasörü seçip Batch (Parti) ögesini işaretleyin ve klasörü seçmek için mavi oka  tıklayın.
5. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.

6. **Units** (Birimler) panelinde 13 bileşenin seçili olduğunu görsel olarak onaylayın. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.



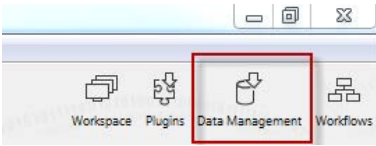
Not: BRCA 1/2 CE-IVD Workflow ilk kez kullanıldığında referans verilerini **CLC_References** klasöründen seçmelisiniz.

Biomedical Genomics Workbench'i ilk kez açtığınızda referans verilerinin yerel veya sunucu **CLC_References** havuzuna indirilebileceğini belirten bir mesaj belirten iletişim kutusunda görünür.

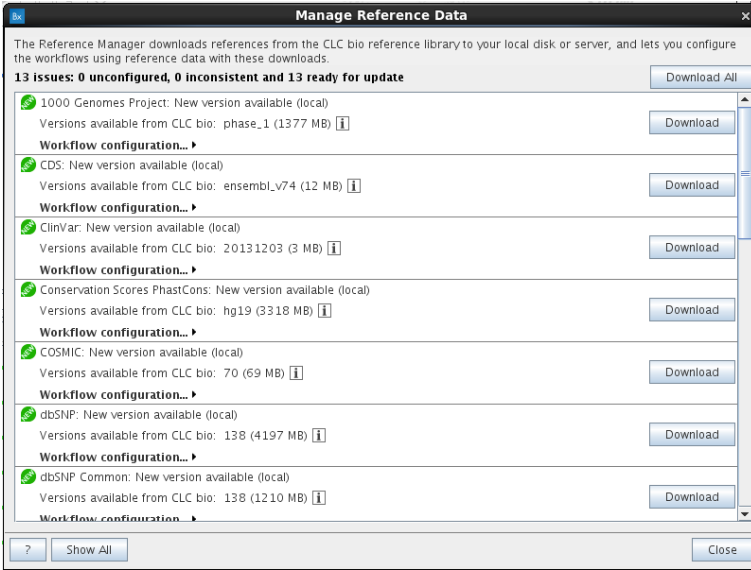


Yes (Evet) ögesini tıklayın. Bu sizi **Manage Reference Data** (Referans Verilerini Yönet) sihirbazına götürecektir.

Bu sihirbaz ayrıca Biomedical Genomics Workbench'in sağ üst köşesinde **Data Management** (Veri Yönetimi) ögesine tıklayarak erişilebilir.



Referans verilerini yüklemek için **Data Management** (Veri Yönetimi) ögesine tıklayın ve aşağıdaki referans veritabanlarını indirin: 1000 Genomes Project, CDS, ClinVar, Conservation Scores PhastCons, Cosmic, dbSNP, dbSNP Common, Genes, HapMap, mRNA, Sequence, Target Primers, Target Regions.



Daha fazla bilgi için bkz. *Biomedical Genomics Workbench Uygulama Kılavuzu*, Bölüm 4.1 “Referans verileri”.

Aşağıda verilen 7. ila 22. adımları gerçekleştirmek için **CLC_References** içinden referans verilerini seçin.

Örneğin 7. adımda CDS için akışı girdisi aşağıdaki dizinden seçilmelidir:

CLC_References/homo_sapiens/cds/ensembl_V74/Homo_sapiens_ensembl_v74_CDS

Not: İlk kullanımdan sonra, aşağıdaki 16 adım (7–22) sadece ekranın altındaki **Next** (İleri) ögesini tıklayarak ekranları geçmeyi gerektirir.



7. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın.



8. **Next (Sonraki) öğesine tıklayın.**



9. **Next (Sonraki) öğesine tıklayın.**



10. **Next (Sonraki) öğesine tıklayın.**



11. **Next (Sonraki) öğesine tıklayın.**



12. **Next (Sonraki) öğesine tıklayın.**



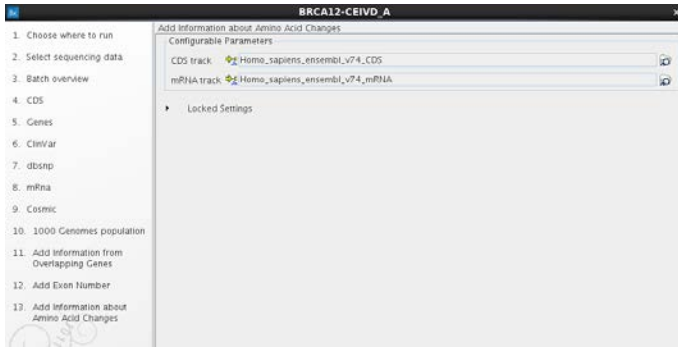
13. **Next (Sonraki)** ögesine tıklayın.



14. **Next (Sonraki)** ögesine tıklayın.



15. **Next (Sonraki)** ögesine tıklayın.



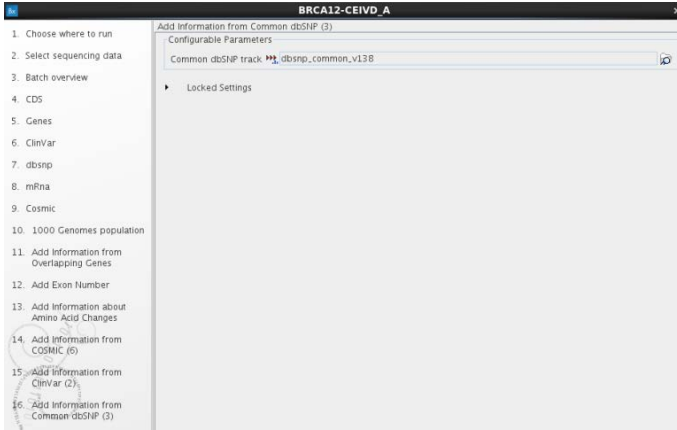
16. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



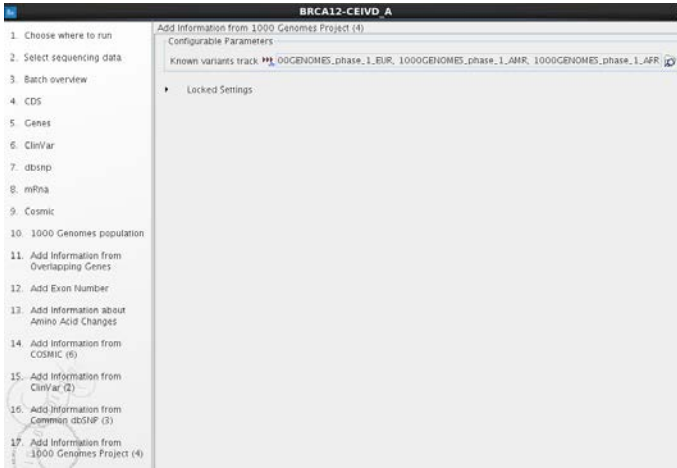
17. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



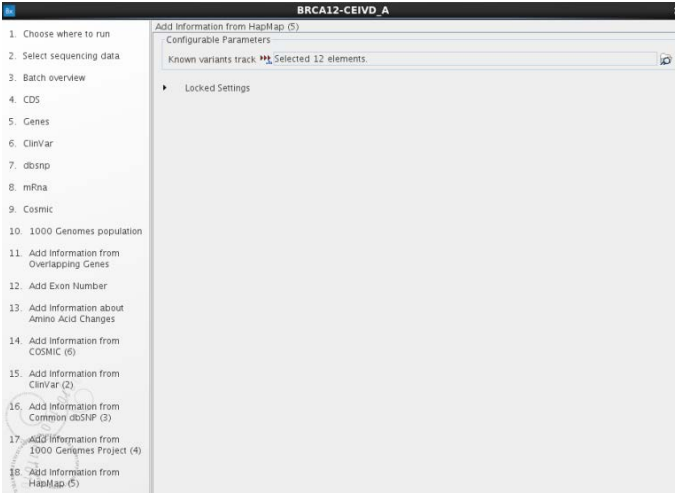
18. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



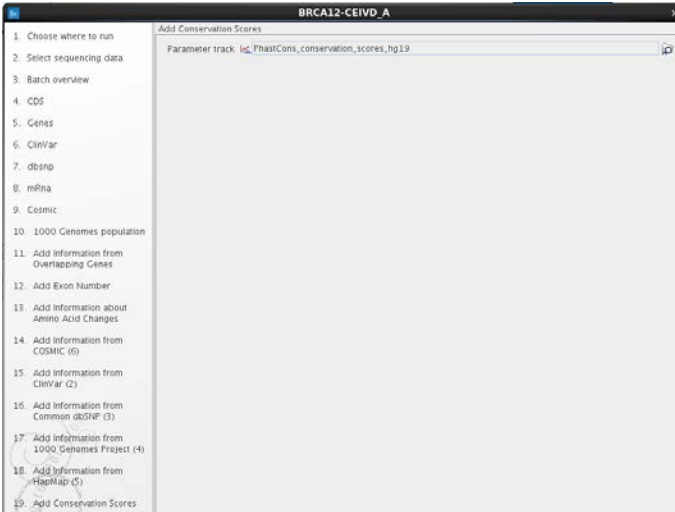
19. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



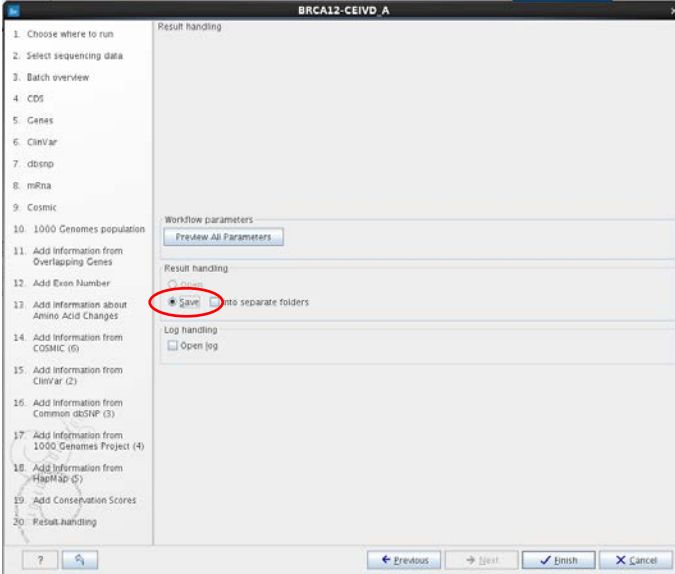
20. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



21. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



22. Next (Sonraki) ögesine tıklayın.



23. **Save** (Kaydet) seçimini yapın ve ardından **Finish** (Bitti) ögesine tıklayın. Sıralama analizi başlayacaktır.

Sıralama analizi tamamlandıktan sonra ve varyant analizine ilerlemeden önce:

- Pozitif kontrolde amplicon başına minimum okuma sayısının $> 200\times$ olduğunu doğrulayın.

Bu, *BRCA1/BRCA2* ampliconları boyunca yeterli homojenlik bulunduğunu gösterir.

- Örneklerde amplicon başına minimum okuma sayısının $> 200\times$ olduğunu kontrol edin.

ÖNEMLİ: Nihai analiz için sadece kapsamı > 200 okuma olan hedeflerin kullanılmasını öneririz. Amplicon başına elde edilen minimum kapsama “Locally realigned trimmed reads read mapping (coverage) region statistics” (Lokal olarak yeniden hizalanmış kırılmış okumaların okuma eşlemesi (kapsama) bölge istatistiği) raporunda bulunabilir.

Okuma özgüllüğü hedef bölge ile hizalanmış okumaların yüzdesini belirler. Sıralama özgüllüğünü hesaplamak ve yeterli olduğunu sağlamak için “Mapping summary report”u (Eşleme özet raporu) (bkz. Tablo 7) açıp, toplam okuma sayısını bulup ardından

“Coverage summary report”u (Kapsama özet raporu) açın. Hedef bölgeye hizalanmış okumalar için veriler “Kapsama özet raporu”nun “Hedef bölgelere genel bakış” kısmında (bkz. Tablo 8) gösterilmektedir. Bu örnek için okuma özgüllüğü %92'dir. > %80 okuma özgüllüğü öneririz.

Tablo 7. Eşleme özet raporu

Özet istatistiği					
	Sayı	Okumaların yüzdesi	Ortalama uzunluk	Baz sayısı	Bazların yüzdesi
Referanslar	25	–	123.827.759,24	3.095.693.981	–
Eşlenmiş okumalar	3.012.232	%98,91	143,92	433.521.188	%99,16
Eşlenmemiş okumalar	33.274	%1,09	110,32	3.670.839	%0,84
Eşli okumalar	2.962.962	%97,29	148,38	426.681.289	%97,60
Kırık eşli okumalar	49.270	%1,62	138,82	6.839.899	%1,56
Toplam okuma	3.045.506	%100	143,55	437.192.027	%100

Tablo 8. Hedeflenmiş bölgelere genel bakış

Referans	Eşlenmiş toplam okuma	Hedeflenmiş bölgede eşlenmiş okumalar	Özgüllük (%)	Toplam eşlenmiş okuma, yoksayılanlar hariç	Hedef bölgede toplam eşlenmiş okuma, yoksayılanlar hariç	Özgüllük (%), yoksayılanlar hariç
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	–
Toplam	2.807.043	2.807.043	100,0	2.807.043	2.807.043	100,0

Kalite kontrol kriterleri

- NA12878 pozitif kontrolde amplikon başına minimum kapsama 200× olmalıdır.
Sıralama çalışmasının doğrulanmasını ve sıralama hizalaması sağlamak için amplikonlar arasında yeterli okuma derinliği kapsamı bulunur.
- Örneklerde amplikon başına minimum kapsama 200× olmalıdır.
Bu, kapsamının homojenliğini ve örneklerin kalitesini sağlar.
- Primerlerin özgüllüğünü sağlamak için okumaların > %80'i NA12878 pozitif kontrolde hedef bölgeye hizalanmıştır.
- Primerlerin özgüllüğünü sağlamak için okumaların > %80'i örneklerde hedef bölgeye hizalanmıştır.

Bu kalite kontrol kriterleri sağlanmazsa, bkz. "Sorun Giderme Kılavuzu", sayfa 44.

Sonuçların Yorumlanması

Her örnek için Varyant Çağırma Formatı (VCF dosyası) içindeki dosyayı aşağıda anlatıldığı şekilde dışa aktarın ve varyantların klinik önemini tanımlamak için istediğiniz *BRCA1/BRCA2* varyant veritabanına gönderin. Klinik patolojik etkisi olan varyantların tanımlanmış yanlış pozitif varyantlar listesinde mevcut olup olmadığını kontrol edin (bkz. “Yanlış pozitif varyantlar”, sayfa 59 ve Tablo 16, sayfa 64).

Bir varyantın bulunduğu sıralama tipine dikkat edin:

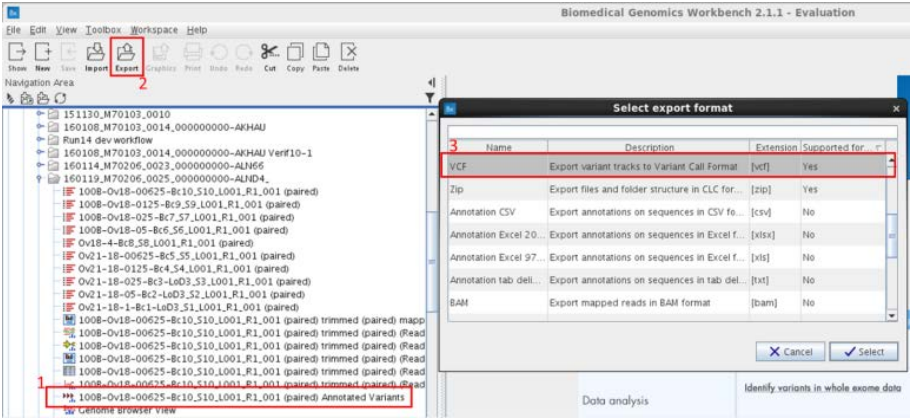
- İntronik sıralama
- Eksonik sıralama
- Komşu/yan (hedef bölgenin öncesi ve sonrasında 20 nt)
- Homopolimer
- Nükleotid germe bölgesi

Not: Homopolimerler (> 6 nükleotid) ve nükleotid germe bölgeleri (di- veya tri-nükleotid tekrarlar) yanlış pozitif kaynaklarıdır. Karşılık gelen varyantlar dikkatli değerlendirilmelidir. Alternatif bir sıralama yöntemi kullanarak (ör. Sanger sıralaması) onaylayıcı bir deney yapılmasını öneririz.

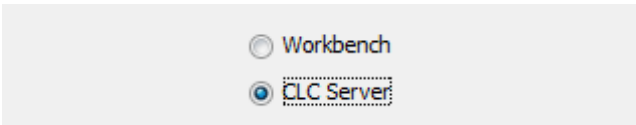
Not: Varyantların yorumlanması bir klinik genetikçi tarafından yapılmalıdır.

VCF dosyasını dışa aktarma

1. **Navigation Area** (Navigasyon Alanı) paneli içindeki “Annotated Variants” (Ek Açıklamalı Varyantlar) dosyasını seçin (1).
2. Araç çubuğunda **Export** (Dışa Aktar) düğmesine tıklayın (2).
3. **Select export format** (Dışa aktarma formatını seç) penceresinde, **VCF** öğesini seçin (3) ve **Select** (Seç) öğesine tıklayın.



4. Bir CLC Sunucusunda oturum açtıysanız dışa aktarma işini Workbench ile mi yoksa CLC Sunucusu ile mi yapmak istediğiniz sorulacaktır. **Workbench** veya **CLC Server** (CLC Sunucusu) öğesini seçin.



5. **Next** (Sonraki) öğesine tıklayın.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit kullanarak *BRCA1/2* mutasyon durumu değerlendirmesinde ortaya çıkabilecek her tür problemi çözmeye yardımcı olabilir. İletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

Diğer kitler hakkında sorun giderme bilgileri için lütfen ilgili kit el kitaplarına bakın.

Illumina MiSeqDx cihazı ile Biomedical Genomics Workbench ve BRCA 1/2 CE-IVD Workflow dahil ilgili yazılımlar hakkında sorun giderme bilgileri için lütfen ilgili kullanım kılavuzlarına ve el kitaplarına bakın.

Yorum ve öneriler

Hedef DNA'da düşük verim

- | | |
|--|---|
| a) gDNA konsantrasyonunu kontrol edin | FFPE başlangıç materyalinden gDNA miktar tayini için bir florometre kullanılmasını öneririz.

Aşağı yönde deneylerde yeterli örnek miktarını garanti etmek için gDNA konsantrasyonu > 2,5 ng/μl olmalıdır. Kit, her hedef PCR reaksiyonu için (toplam 40 ng) 10 ng gDNA için optimize edilmiştir. |
| b) Hedef PCR (T-PCR) havuzlama ve saflaştırma işleminin ardından elde edilen pozitif kontrol konsantrasyonunu kontrol edin | NA12878 pozitif kontrolün konsantrasyonu 20 ng/μl'den az ise T-PCR sırasında veya örnek havuzlama ve saflaştırma adımı sırasında bir hata oluşabilir.

Tüm örnekler için T-PCR adımını tekrarlayın. |

Yorum ve öneriler

- c) T-PCR havuzlama ve saflaştırma işleminin ardından örneklerin konsantrasyonunu kontrol edin
- 4 ng/μl kalite kontrol kriteri altındaki örnek konsantrasyonu bozulmuş DNA'ya işaret edebilir.
- Başarısız olan örnekten DNA numunesi almayı tekrarlayın.

Düşük kütüphane verimleri

- a) T-PCR verimlerini kontrol edin
- T-PCR sonrasında ve kütüphane hazırlamaya ilerlemeden önce pozitif kontrollerin ve örneklerin konsantrasyonları sırasıyla > 20 ng/μl ve > 4 ng/μl olmalıdır.
- Pozitif kontrolün konsantrasyonu düşükse, tüm örnekler için T-PCR adımını tekrarlayın.
 - Bir örneğin konsantrasyonu çok düşükse, örnek DNA'nın numune alma işlemini tekrarlayın.
- b) Kütüphane hazırlama ve boyut seçim adımları sonrasında pozitif kontrolün konsantrasyonunu kontrol edin
- Saflaştırılmış ve boyutu seçilmiş kütüphanelerin miktar tayinini Illumina uyumlu bir qPCR kütüphane miktar tayini kitiyle yapın. Kalite kontrol kriterleri karşılanmazsa kütüphane miktar tayinini tekrarlayın.
- NA12878 pozitif kontrolün konsantrasyonu 120 nM'den azsa, kütüphane hazırlama, boyut seçimi, PCR amplifikasyonu veya PCR saflaştırma adımları sırasında bir hata oluşmuş olabilir.
- Tüm örnekler için kütüphane oluşturmaya gDNA'dan tekrar başlayın.

Yorum ve öneriler

- c) Kütüphane hazırlama ve boyut seçim adımları sonrasında örneklerin konsantrasyonunu kontrol edin
- Saflaştırılmış ve boyutu seçilmiş kütüphanelerin miktar tayinini Illumina uyumlu bir qPCR kütüphane miktar tayini kitiyle yapın. Protokolde anlatılan qPCR kalite kontrol kriterlerine dikkat edin.
- Örnek konsantrasyonu 80 nM'den azsa, kütüphane hazırlama, boyut seçimi, PCR amplifikasyonu veya PCR saflaştırma adımları sırasında bir hata oluşmuş olabilir.
- İlgili örnek için kütüphane oluşturmaya gDNA'dan tekrar başlayın.

Düşük sıralama verisi çıktısı (Toplam okuma < 3 Gb)

Illumina sıralama kartuşuna eklenen kütüphane materyalinin miktarını kontrol edin

Hedeflenen *BRCA1/2* bölgesinin bölümlerini yanlış okumaktan kaçınmak için toplam 3 Gb sıralama verisi çıktısı önerilir. 3 Gb kalite kriteri karşılanmazsa, protokolü kütüphane miktar tayini adımından tekrar başlatın.

Illumina akış hücresi görüntülerini üreticinin talimatları doğrultusunda kontrol edin.

- Kütüphane aşırı yüklenmişse (küme yoğunluğunu doyumluğa ulaştıracak biçimde) kartuşa eklenen havuzlanmış kütüphanelerin miktarını azaltın.
- Kümelenme yoğunluğu düşükse, kartuşa eklenen havuzlanmış kütüphanelerin miktarını artırın.

Yorum ve öneriler

Düşük sıralama özgüllüğü (*BRCA1/2* hedef bölgesiyle hizalanmış okumaların %'si)

Boyuta göre seçilmiş ve saflaştırılmış kütüphanelerin ortalama boyutunu kontrol edin

%80 özgüllük kalite kontrol kriteri karşılanmamışsa kütüphane parçacık boyutunu analiz ederek saflaştırma kalitesini değerlendirin. Ortalama amplicon boyutu 280 bp civarında olmalıdır.

Protokolü T-PCR'dan tekrar başlatın.

Düşük okuma kapsaması

Amplicon başına minimum kapsamayı kontrol edin

200x kapsama kalite kriteri karşılanmıyorsa şunları öneririz:

- 4 hedef PCR reaksiyonunun eşdeğer hacimlerde havuzlanmış olduğunun kontrol edilmesi.
- 10 örnek artı pozitif kontrolde her örnek için elde edilen okuma sayısı bazında okuma homojenliğinin kontrol edilmesi.

Şablonsuz kontrolün (NTC) kontamine olması

a) T-PCR sonrasında NTC'yi kontrol edin

NTC için örnek saptanırsa, T-PCR sırasında veya örnek havuzlama ve saflaştırma adımı sırasında kontaminasyon olmuş olabilir.

T-PCR'yi yeniden başlatın.

b) Kütüphane hazırlama ve boyut seçim adımları sonrasında NTC'nin konsantrasyonunu kontrol edin

NTC konsantrasyonu 1 nM'den fazlaysa, kütüphane hazırlama, boyut seçimi, PCR amplifikasyonu veya PCR saflaştırma adımları sırasında kontaminasyon oluşmuş olabilir.

T-PCR'yi yeniden başlatın.

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir.

Sınırlamalar

Kit, profesyonel kullanım için üretilmiştir.

Ürün yalnızca özel eğitim almış, moleküler biyoloji teknikleri konusunda öğrenim görmüş ve bu teknolojiyle ilgili bilgi sahibi olan personel tarafından kullanılmalıdır.

Bu kit, "Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler: Analiz", sayfa 7'da belirtilen onaylanmış bir cihazla birlikte bu kılavuzda verilen aşağıdaki talimatlarla kullanılmalıdır.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihleri geçmiş bileşenleri kullanmayın.

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti sadece tamponlu formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku için doğrulanmıştır.

Örnek kütüphane sıralaması için sadece Illumina MiSeqDx doğrulanmıştır.

Bu ürünün herhangi bir etiket dışı kullanımı ve/veya bileşenlerin değiştirilmesi QIAGEN sorumluluğunu geçersiz kılar.

QIAGEN performans çalışmaları kapsamında olmayan laboratuvarlarında kullanılan herhangi bir prosedür için sistem performansının doğrulanması kullanıcıların sorumluluğundadır.

Mutasyonların tespit edilmesi, örneğin bütünlüğüne, tümör içeriğine ve numune içinde bulunan çoğaltılabilir DNA'ya bağlıdır.

Analiz iş akışıyla birlikte *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti kopya sayısı varyasyonu (CNV) analizi için uygun değildir.

Ürün ile elde edilmiş herhangi bir tanı amaçlı sonucun diğer klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlanması gerekir.

Performans Özellikleri

ÖNEMLİ: *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin test performans özellikleri BRCA 1/2 CE-IVD Workflow içeren Biomedical Genomics Workbench yazılımı raporlama aracıyla elde edilmiştir. İş akışının tümü rutin kullanıma sokulmadan önce laboratuvar son kullanıcısı tarafından bağımsız doğrulamaya tabi tutulmalıdır.

Testin bildirilebilir aralığı

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin tasarımı *BRCA1* ve *BRCA2*'nin tüm kodlama bölgesinin yanı sıra her kodlama eksonunun yanında ez 20 bp'yi kapsar. Kitin kapsamı hakkında bilgi Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Kapsama bilgisi

Kapsama	Değer sayısı	FFPE	NA12878
		82 örneki	67 örnek
Minimum kapsama	Minimum	1863	813
	Medyan	5624	4725
	Ortalama	5591	5187
	Maksimum	11.890	14.187
	Kapsaması $\geq 200\times$ olan verinin %'si	%100	%100
Normalize edilmiş minimum kapsama* (sıralama çalışması başına 3 GB veriye eşdeğerdir)	Minimum	1142	539
	Medyan	3499	3124
	Ortalama	3494	3416
	Maksimum	7383	9211
	Kapsaması $\geq 200\times$ olan verinin %'si	%100	%100

* Sıralama çalışması başına ampikon kapsamı kit ile elde edilen minimum kapsamı aşağıdaki oranla çarparak normalize edilmiştir: 3 Gb (önerilen minimum sıralama verisi çıktısı)/Çalışma sıralama çıktısı (Gb cinsinden).

Amplifikasyon homojenliği

Veriler 82 FFPE örnek veri seti içinde hedeflenmiş konumların %99,29'unun kapsamanın ortalama derinliğinin %20'sinden yüksek bir grup okuma ile kapsandığını göstermiştir (%95 tahmin aralığı %96,81–100).

Engelleyici maddeler

FFPE DNA numune alma kitinden gelen reaktifler ve FFPE örneklerindeki olası engelleyici maddeler *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti performansı üzerindeki olası etkisi açısından test edilmiştir. Engelleyici koşul veya maddelerin performans üzerinde DNA ve kütüphane miktar tayini, sıralama veya varyant çağırma açısından bir etkisi görülmemiştir.

Taşıma

Spesifik oligonükleotid sıralamalarının bağlanması Illumina küme oluşturma ve örneklerin tanımlanması için kullanılır. 12'şer barkodlu 2 setin ardışık çalışmalarda sıralı kullanımı kontaminasyon riskini azaltır.

İlk adaptör setiyle barkodlanmış örnekler Çalışma 1 adlı sıralama çalışmasında kullanılmıştır. Örnek olmadan Çalışma 2 ve Çalışma 3 adlı iki ek sıralama çalışması gerçekleştirilmiş ve ilk setten geriye kalan tüm barkodların çalışmalar arasında taşınması sırasında gerçekleşen kontaminasyonu ölçmek için Çalışma 2 ve Çalışma 3'te miktar tayini yapılmıştır. İkinci bir barkod seti kullanarak aynı deney seti gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan çalışmaya taşıma sırasında gerçekleşen kontaminasyonun global yüzdesi, müşterinin mevcut iki barkod setini sırayla kullandığı düşünülerek Çalışma 1 ve Çalışma 3'ten elde edilen okumaların oranının karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

Çalışma 1'in Çalışma 3'te saptanmaya devam eden örnek okumalarının yüzdesi olarak tanımlanan çalışmadan çalışmaya taşıma birinci ve ikinci barkod setleri için sırasıyla %0,43 ve %0,47'dir.

İsabetli okumalar (test özgüllüğü)

İsabetli okumalar hedef bölge ile hizalı okumaların örnekten elde edilen toplam okumalara oranı olarak belirlenir. Yüzde, şu formüle göre hesaplanır:

$$\text{İsabetli okumalar (\%)} = \frac{\text{Hedef bölge ile hizalı okumaların sayısı} \times 100}{\text{Toplam okuma sayısı}}$$

İsabet istatistiği 52 FFPE kökenli DNA numunesinin 3 farklı kit lotunda kullanıldığı 82 veri setinden elde edilmiştir. Ortalamada okumaların %94,51'i hedef bölge ile hizalıdır (Tablo 10).

Tablo 10. İsabetli okumalar (test özgüllüğü)

Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart sapma
%94,51	%87,67	%96,17	%1,4

Test hassasiyeti

Test tekrarlanabilirliği (çalışma içi hassasiyeti) ve tekrar üretilebilirliği (çalışmalar arası hassasiyeti) allel frekansı (AF) açısından değerlendirilmiştir. %5 ile %15 arasında beklenen AF bulunan en fazla varyantı oluşturmak için iki karışık örnek üretilmiştir. Bu örnekler kopyalı olarak 6 sıralama çalışmasında 2 MiSeqDx platformu (cihazlar arası tekrar üretilebilirlik), 3 kullanıcı (kullanıcılar arası tekrar üretilebilirlik) ve 3 kit lotu (lotlar arası değişkenlik) kullanılarak test edilmiştir.

Amaç, her seviyede (lot, kullanıcı, cihaz, kopyalar) eklenen toplam değişkenliğin bağlı oranlarını belirlemektir. Değişkenlik bileşenlerinin analizi toplam değişkenliğin ana bileşeninin tekrar edilebilirlik olduğunu göstermiştir; yani çalışma içi kopyalardan kaynaklanmaktadır (bkz. Tablo 11; sütun Sr).

Tablo 11. 2 örnek için 36 veri setinde saptanan tüm varyantların derlemesi

Varyant Pozisyonu & Ref allel > Varyant allel	Beklenen AF	Hesaplanan ortalama AF (n = 36)	SD*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Stotal*	Güvenilirlik†
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
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

Varyant Pozisyonu & Ref allel > Varyant allel	Beklenen AF	Hesaplanan ortalama AF (n = 36)	SD*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Stotal*	Güvenilirlik†
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
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

Varyant Pozisyonu & Ref allel > Varyant allel	Beklenen AF	Hesaplanan ortalama AF (n = 36)	SD*	CV* (%)	Sr*	Si*	So*	Sin*	Stotal*	Güvenilirlik†
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

* SD: standart sapma; CV: varyasyon katsayısı (Stotal/Ortalama) Sr: SD tekrarlanabilirlik (lot içi hassasiyet); Si: SD lotlar arası; So: SD kullanıcılar arası; Sin: SD cihazlar arası; Stotal: SD toplam (lab içi hassasiyet).

† Güvenilirlik = $(Sr^2/Stotal^2) \times 100$

Tespit Sınırı (LOD)

Test eşiği

Allel frekansı için test eşiği Tablo 13, Tablo 14 ve Tablo 16'da anlatılan yanlış pozitif varyantların çıkarılmasından sonra saptanan varyantların %99,9'unu doğru pozitif varyantların oluşturduğu minimum allel frekansı olarak tanımlanmıştır. Varyant allel frekansı (VAF) eşiği daha önce karakterize edilmiş 53 örnek için %5,75 olarak hesaplanmıştır: Coriell Tıbbi Araştırma Enstitüsü havuzundan alınan 13 örnek ve 20 klinik FFPE örneği 3 kit partisi kullanılarak kopyalı olarak test edilmiştir.

Testin %1,5 değerinde VAF saptayabildiğini göstermek için FFPE DNA tümörden elde edilmiş 4 ayrı örnek bir başka FFPE DNA tümörden elde edilmiş örnekle farklı oranlarda karıştırılmıştır. Çoklu örnekler arasındaki homojenlik azalmasını tekrar üretmek için, sıralama çalışmaları 4 nM (önerilen miktar) ile 0,125 nM arasında değişen kartuşa yüklenmiş kütüphane şeklinde azalan miktarlarda kütüphane materyali kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NA12878 pozitif kontrol DNA miktarını artırarak toplam kütüphane girdisi 4 nM sabit konsantrasyonda korunmuştur.

Test hassasiyeti probit analizi ile hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 12'de bildirilmektedir. 4 nM'lik bir kütüphane girdisi için test, varyantları %1,54 düzeyinde VAF'ta saptamaktadır.

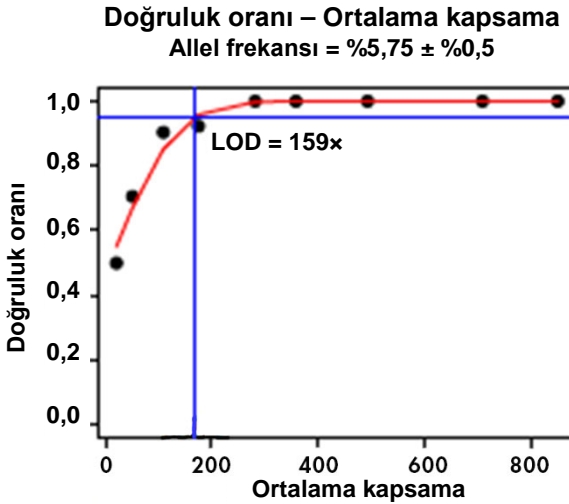
Tablo 12. Test hassasiyeti: azalan kütüphane girdisi ile saptanan minimum VAF

Kütüphane girdisi (örnek)	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

%5,75 düzeyinde VAF saptamak için minimum kapsama

%5,75 düzeyinde VAF eşliğini çağırarak için minimum kapsama (toplam okuma sayısı) değerlendirilmiştir. Dört bağımsız FFPE DNA tümörden elde edilmiş örnek diğer bir FFPE DNA tümörden elde edilmiş örnekle farklı oranlarda karıştırılarak %5,25 ile %6,25 arasında değişen VAF değerleri elde edilmiştir (tahmini medyan VAF değeri %5,75). Aynı karıştırılmış örnek setinin iki katlı seri dilüsyonlu çoklu sıralama çalışmaları 4 nM ile 0,015625 nM arasında değişen kütüphane miktarlarıyla gerçekleştirilmiştir. Örneğin 4 nM'lik bir kütüphane girdisiyle 15.000× kapsama elde edildiyse, aynı varyant 0,015625 nM girdiyle 59× olarak saptanacaktır.

Her AF sınıfında LOD belirlenmesi için NCCLS EP17-A2 yönergesini uygulayan bir yöntem kullanılarak probit analizi yapılmıştır (20). Nihai değer AF'yi %95 güven ile saptamak için gereken kapsamadır. Örnek grafik Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Probit analizi. Doğruluk oranı kapsamaya göre saptanan varyantların yüzdesini temsil eder.

%5,75 düzeyinde VAF saptamak için pozisyon başına en az 200 okuma gereklidir. (159× LOD, 200×'e yuvarlanmıştır.)

Doğruluk

Doğruluk Coriell Tıbbi Araştırma Enstitüsü havuzundan gelen DNA ve FFPE yumurtalık tümörü örneklerinden numune alınan DNA dahil daha önce karakterize edilmiş örnekler kullanılarak tahmin edilmiştir.

- Set 1: Coriell havuzundan gelen 13 örnek hedef bölgeyi tamamen karakterize etmiştir (191 varyant beklenmiştir)
- Set 2: Coriell havuzundan gelen 27 örnek hedef bölgeyi 25 patojenik varyant için kısmen karakterize etmiştir (27 varyant beklenmiştir)
- Set 3: FFPE yumurtalık tümörü örneklerinden alınan DNA numunelerinden gelen 20 örnek hedef bölgeyi tamamen karakterize etmiştir (570 varyant beklenmiştir)

Beklenen tüm varyantlar, *BRCA1*'de 40 nükleotidin iki büyük delesyonu dahil (*BRCA1*: c.1175_1214del40 p.Leu392Glnfs) Coriell örneklerinde (Set 1 ve Set 2) saptanmıştır.

Doğruluk aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Doğruluk (\%)} = \frac{(\text{Doğru pozitiflerin sayısı} + \text{Doğru negatiflerin sayısı}) \times 100}{\text{Hedef bölge (21.150 baz)}}$$

FFPE örnekleri (Set 3) için doğruluk allel frekans eşliğini %5,75 olarak belirleyen bir probit yaklaşımı kullanılarak %99,988 olarak hesaplanmıştır.

Varyant kısıtlamaları

Yanlış pozitif varyantlar

47 yanlış pozitifin bir listesi önceden karakterize edilmiş örneklerin bir seti için belirlenmiştir: Coriell havuzundan alınan 13 örnek ve 20 klinik FFPE örneği kopyalı olarak test edilmiştir; n = 53. Yanlış pozitif varyantlar homopolimerik demetleri > 6 nt olan sıralamalar ve/veya di- ve tri-nükleotid germe tekrarları karşısında cihazın kısıtlamalarından kaynaklanır. Yanlış pozitif varyantlar ayrıca primer dimerlerden kaynaklanan artefaktlar olabilir.

BRCA1 kromozom 17 için yanlış pozitif varyantların listesi Tablo 13'te gösterilmiştir. *BRCA2* kromozom 13 için yanlış pozitif varyantların listesi Tablo 14'te gösterilmiştir. Yanlış pozitiflerin (FP) pozisyonu ilk sütunda (Hg19 koordinatları) açıklanmış, bunu takiben bulunan referans (REF) ve alternatif (ALT) nükleotidler verilmiştir. FP varyantlarının bulunduğu veri setlerinin yüzdesi (53 veri setinden) "Veri setleri %'si (n = 53)" sütununda gösterilmiştir. 53 veri setinin minimum, ortalama ve maksimum AF yüzdeleri "Minimum AF (%)", "Ortalama AF (%)" ve "Maksimum AF (%)" sütunlarında gösterilmiştir. Varyantlar 4 kategori altında sınıflandırılır: "Homopol" (> 6 nt homopolimerik demetlerden kaynaklı FP), "Primer dimer" (primer dimer artefaktlarından kaynaklı FP), "Germe" (di- ve tri-nükleotid tekrarlarından kaynaklanan FP) ve "Diğer" (polimeraz sentezi ve/veya sıralama hatalarından kaynaklanan FP).

Tablo 13. BRCA1 kromozom 17'de saptanan yanlış pozitif (FP) varyantların listesi

Bölge	REF	ALT	Tip	Veri setleri %'si (n = 53)	Minimum AF (%)	Ortalama AF (%)	Maksimum AF (%)	Yanlış pozitif sınıflandırması
41231323	C	T	SNV	9,4	1,3	2,0	2,5	Diğer
41231324	G	A	SNV	9,4	1,1	1,4	2,6	Diğer
41231333	G	C	SNV	7,5	1,0	1,5	1,7	Germe
41231352	T	C	SNV	9,4	1,4	1,8	2,1	Diğer
41231370	C	A	SNV	5,7	1,1	1,2	1,3	Diğer
41231401	C	T	SNV	1,9	1,4	1,4	1,4	Diğer
41231404	T	C	SNV	11,3	1,2	2,4	3,8	Diğer
41231419	G	A	SNV	9,4	1,3	2,5	3,4	Diğer
41242939..41242940	CA	-	Delesyon	100	3,1	4,8	6,1	Germe
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	Diğer
41245586^41245587	-	T	İnsersiyon	96,2	1,1	1,4	2,4	Homopol
41245587	T	-	Delesyon	100	2,3	3,2	3,9	Homopol
41246532	T	-	Delesyon	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol
41246926	A	-	Delesyon	94,3	1,0	1,4	2,0	Homopol
41267808	G	-	Delesyon	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol
41276152^41276153	-	AT	İnsersiyon	94,3	1,1	1,5	2,0	Germe
41276153..41276154	AT	-	Delesyon	100	1,9	2,7	3,3	Germe

Tablo 14. BRCA2 kromozom 13'de saptanan yanlış pozitif (FP) varyantların listesi

Bölge	REF	ALT	Tip	Veri setleri %'si (n = 53)	Minimum AF (%)	Ortalama AF (%)	Maksimum AF (%)	Yanlış pozitif sınıflandırması
32893197^32893198	-	T	İnsersiyon	100	4,3	5,6	6,8	Homopol
32893198	T	-	Delesyon	100	11,0	12,6	13,5	Homopol
32893198..32893199	TT	-	Delesyon	5,7	1,1	1,2	1,3	Homopol
32893318	G	A	SNV	3,8	1,3	1,8	2,2	Diğer
32900364	T	-	Delesyon	75,5	1,0	1,3	1,9	Homopol
32905197	T	-	Delesyon	18,9	1,0	1,1	1,3	Homopol
32905219^32905220	-	T	İnsersiyon	100	8,8	10,4	11,4	Homopol
32905219^32905220	-	TT	İnsersiyon	96,2	1,0	1,2	1,6	Homopol
32905220	T	-	Delesyon	100	19,7	21,1	23,1	Homopol
32905220..32905221	TT	-	Delesyon	100	3,8	4,4	5,4	Homopol
32907421	A	-	Delesyon	94,3	2,2	3,1	3,9	Homopol
32907535^32907536	-	T	İnsersiyon	100	6,8	7,7	10,0	Homopol
32907535^32907536	-	TT	İnsersiyon	3,8	1,0	1,1	1,1	Homopol
32907536	T	-	Delesyon	100	21,4	23,8	26,3	Homopol
32907536..32907537	TT	-	Delesyon	100	3,6	4,6	6,2	Homopol
32911074	A	-	Delesyon	11,3	1,0	1,2	1,6	Homopol
32911443	A	-	Delesyon	9,4	1,0	1,1	1,2	Homopol
32912346	A	-	Delesyon	77,4	1,0	1,2	1,5	Homopol
32913559	A	-	Delesyon	100	1,0	1,5	2,0	Homopol
32913837	A	-	Delesyon	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	Diğer
32953633	A	-	Delesyon	17,0	1,0	1,1	1,3	Homopol
32954022^32954023	-	A	İnsersiyon	13,2	1,0	1,1	1,2	Homopol
32954023	A	-	Delesyon	100	2,1	3,3	4,1	Homopol
32954303	T	-	Delesyon	100	1,5	2,3	2,8	Homopol
32968809	T	-	Delesyon	96,2	2,3	2,6	3,2	Homopol
32972287	T	-	Delesyon	5,7	1,0	1,1	1,2	Homopol
32972526	G	A	SNV	3,8	1,4	1,4	1,4	Diğer

Yanlış negatif varyantlar

Bir genin DNA'sına ekstra baz çiftleri eklenebilir (insersiyon) veya çıkarılabilir (delesyon). Sayı bir ila binlerce arasında olabilir. Bu mutasyonların tümüne indeller denir. *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit performansı substitüsyon varyantlarının ve küçük indellerin (≤ 3 nt) saptanmasına dayanarak belirlenmiştir. Büyük indeller (> 3 nt) saptanmıştır ancak bu büyük indellerin saptanması için performans özellikleri belirlenememiştir.

Bu analiz iş akışıyla birlikte *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti kopya sayısı varyasyonu (CNV) analizi için uygun değildir.

Seçilen bölgelerden varyantların varlığından kaçınmak için *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin primer bağlanma alanları seçilir. Bu, primer bağlanma bölgesi bulunan ve hatalı amplifikasyona yol açan seyrek varyantların varlığını ve klinik açıdan ilgili olası mutasyonların varlığını olasılık dışı bırakmaz. Böyle bir fenomenden şüpheleniliyorsa, alternatif bir yöntem kullanarak onaylayıcı bir deney gerçekleştirilmesini öneririz.

Doğrulama sonuçları

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kitinin doğrulama çalışması yumurta tümör dokusundan alınan FFPE örnekleri üzerinde 2 ayrı kit partisi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma normal kullanım koşullarındaki performansı değerlendirmiştir: 40 ng girdi, %5,75 varyant allel frekansı eşiği ve 200× kapsama.

Toplam 171 yumurtalık FFPE tümörü örneği sağlanmış ve birlikte çalışan 3 laboratuvar tarafından karakterize edilmiştir: Biri Fransa'daki Curie Enstitüsü, biri Almanya'da ve diğeri İngiltere'dedir. Laboratuvarlar *BRCA1/2* varyantlarını tanımlamak için kendi istedikleri yöntemi seçmekte serbesttir ve varyant çağırma için farklı platformlar, testler, yazılımlar ve algoritmalar kullanmıştır.

Klinik örnekleri daha da karakterize etmek için harici bir sıralama hizmeti sağlayıcısı bağımsız biyoanalitik bir platform kullanarak sonuç sağlamak için Multiplicom BRCA Tumor MASTR™ Plus Dx testini kullanmıştır.

Tüm yöntemlerden gelen sonuçlar varyantları aşağıdaki şekilde sınıflandırmak için kullanılmıştır:

- Doğru pozitif (TP): *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit verisine dayanan ve diğer yöntemlerin en az birinde mevcut varyant çağırma
- Doğru negatif (TN): *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit sonuçlarına ve işbirliklerine dayanarak hiç varyant çağırma yok
- Yanlış pozitif (FP): *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit verisine dayanan ancak diğer yöntemlerde bulunmayan varyant çağırma
- Yanlış negatif (FN): *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit verisinde bulunmayan ancak diğer yöntemlerin en az birinde mevcut varyant çağırma

Doğru negatif varyantların sayısını hesaplamak için hedef bölge 3 yöntemin kesişimi olan ve 19.612 nükleotidi temsil eden bölge olarak tanımlanmıştır. Bu hedef bölgenin dışında kalan üç benzersiz varyant analizin dışında tutulmuştur.

Sınıflandırma sonrasında 3 yöntem ile elde edilmiş 2130 varyant arasında bir negatif varyant ve 4 yanlış pozitif varyant gözlemlenmiştir. *BRCA1* kromozom 17 için tutarsız sonuç (yanlış negatif) Tablo 15'te gösterilmiştir. *BRCA2* kromozom 13 için tutarsız sonuçlar (yanlış pozitif) Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 15. *BRCA1* kromozom 17 için 3 yönteme göre tutarsız sonuç (tüm varyantlar)

Genom konumu GRCh37	REF*	ALT*	Tip	<i>therascreen</i> kiti VAF* (%)	Beklenen VAF (%)	Klinik önem	Varyant sınıflandırması
41276067	29	–	Delesyon	Saptanmadı	71,11	Patojenik	Yanlış negatif

* REF: Referans nükleotid; ALT: Alternatif nükleotid; VAF: Varyant allel frekansı; SNV: Tek nükleotid varyasyonu.

Tablo 16. BRCA2 kromozom 13 için 3 yönteme göre tutarsız sonuçlar (tüm varyantlar)

Genom konumu GRCh37	REF*	ALT*	Tip	therascreen kiti VAF*	Beklenen VAF (%)	Klinik önem	Varyant sınıflandırması
32906729	A	C	SNV*	99,83	Saptanmadı	Bilinmiyor	Yanlış pozitif
32912299	T	C	SNV	34,59	Saptanmadı	Bilinmiyor	Yanlış pozitif
32912299	T	C	SNV	71,86	Saptanmadı	Bilinmiyor	Yanlış pozitif
32913709	T	–	Delesyon	43,18	Saptanmadı	Patojenik	Yanlış pozitif

* REF: Referans nükleotid; ALT: Alternatif nükleotid; VAF: Varyant allel frekansı; SNV: Tek nükleotid varyasyonu.

BRCA1 g.41276067 c.19_47del29 yanlış negatif varyantı bir yumurtalık FFPE örneğinden gelen *BRCA1* üzerindeki 29 nükleotidin büyük bir delesyonudur. Bu delesyon daha önce *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA Kit iş akışı kullanılarak mesaneden gelen bir FFPE örneğinde saptanmıştır.

Üç yanlış pozitif tek nükleotidik varyant saptanmıştır. Biri *BRCA2* g.32906729 bölgesinde ve ikisi *BRCA2* g.32912299 bölgesinde bulunmaktadır. Multiplicom testi bu bölgeler için çok düşük kapsama göstermiştir: Sırasıyla 28×, 38× ve 0×. BAM sıralama hizalama dosyalarıyla yapılan araştırma iki varyantın eşit allel frekanslarında oluştuğunu göstermiştir: Sırasıyla 28/28 (%100 VAF) ve 9/38 (%24 VAF). Tutarsızlıklar muhtemelen bir amplikon kopmasından kaynaklıdır.

BRCA2 g.32913709delT yanlış pozitif varyantı amplikonun ilk nükleotidinde bulunmaktadır. Karşılık gelen amplifikasyon primeri, g.32913703 del TACT adlı doğru bir patojenik varyant içeren bir sıralamayı hibridleştirir. Bu delesyon *therascreen* *BRCA1/2* NGS FFPE gDNA Kit testi tarafından saptanmıştır ve bunun varlığı bu yanlış pozitif varyantın ortaya çıkmasına yol açan hatalı hizalanmış primeri açıklayabilir. Bu hatalı pozitif bir hastanın hatalı sınıflandırılmasına asla yol açmayacaktır çünkü doğru patojenik varyantın saptanmasına sistematik olarak bağlıdır.

Çalışmanın sonuçları bir ihtimal tablosunda (Tablo 17) gösterilmiştir ve hassasiyet ve özgüllüğün genel değerlendirilmesi Tablo 18'de gösterilmiştir.

- Klinik hassasiyet pozitif uzlaşım olarak tanımlanmıştır:
Doğru pozitif / (Doğru pozitif + Yanlış negatif)
- Klinik özgüllük negatif uzlaşım olarak tanımlanmıştır:
Doğru negatif / (Yanlış pozitif + Doğru negatif)
- Doğruluk, test sonuçları ile işbirliği ve üçüncü yöntemden gelen sonuçlar arasındaki genel uzlaşım olarak tanımlanmıştır:
Doğru pozitif + Doğru negatif / Hedef bölgedeki baz sayısı

Tablo 17. *therascreen* BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti'nin hesaplanan performansı ile ihtimal tablosu

		İşbirliğinden ve Multiplicom testinden gelen sonuçlar (Referans yöntem)		
		Pozitif	Negatif	Toplam
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti testi sonuçları	Pozitif	2125 Doğru pozitif	4 Yanlış pozitif	2129
	Negatif	1 Yanlış negatif	3.351.522 Doğru negatif	3.351.523
	Toplam	2126	3.351.526	3.353.652

Tablo 18. Diğer yöntemlere kıyasla hassasiyet, özgüllük ve doğruluk

Parametre	Sonuç	%95 GA
Hassasiyet	%99,9530	%99,7382–100
Özgüllük	%99,9999	%99,9997–100
Doğruluk	%99,9998	%99,9996–100

Referanslar

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, Ie 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).

Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	Katalog numarası
	Üretici
	Materyal numarası
Rn	R harfi El Kitabı revizyonunu, n harfi ise revizyon numarasını temsil eder
	Lot numarası
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Avrupa uyumluluğu için CE işareti
	Son kullanma
	N reaksiyon için yeterli reaktif içerir
<N>	

Sembol**Sembol tanımı**



Sıcaklık sınırlaması



Bileşenler (ör. ürüne dahil edilenlerin listesi)



İçindekiler (içerik)



Sayı (ör. flakon, şişe)



Dikkat



Kullanım talimatlarına bakın



Güneş ışığından uzak tutun

Sipariş Bilgileri

Diğer gerekli ürünler ve reaktifler ile ilgili sipariş bilgileri Bölüm 1, sayfa 15'teki Tablo 1'de bulunabilir.

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>therascreen</i> BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kit CE (20)	20 reaksiyon için: <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> 'deki varyantların Illumina MiSeqDx platformunda tanımlanması için; BRCA Primer Karışımı 1, BRCA Primer Karışımı 2, BRCA Primer Karışımı 3, BRCA Primer Karışımı 4, HotStarTaq DNA polimeraz, GR NGS Panel 5x PCR Tamponu V2, NTC için nükleaz içermeyen su	875011

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri ve yerel dağıtıcınızdan istenebilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu ürün in vitro tanı amaçlı kullanım içindir. QIAGEN ürünleri tekrar satılamaz, yeniden satış için değiştirilemez veya QIAGEN'in yazılı izni olmadan ticari ürünler üretmek üzere kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgiler önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilecek herhangi bir hata için hiçbir sorumluluk kabul etmez. Bu belgenin yayınlama sırasında tam ve doğru olduğuna inanılmaktadır. Hiçbir durumda QIAGEN size karşı bu belgenin kullanımıyla ilgili veya bundan doğan rastlantısal, özel, çoklu veya dolaylı zarar için yükümlü olmaz.

QIAGEN ürünleri belirtilen özellikleri karşılamak üzere garanti edilmiştir. QIAGEN'in yegane yükümlülüğü ve müşterinin yegane telafi hakkı ürünlerin garanti edildiği şekilde uygulanamaması durumunda ürünlerin ücretsiz olarak değiştirilmesi ile sınırlıdır.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, *therascreen*® (QIAGEN Grup); 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 Grup); SUSE® (SUSE PLC). Bu belgede geçen kayıtlı isimler, ticari markalar, vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarca korunmaktadır.

therascreen BRCA1/2 NGS FFPE gDNA Kiti için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımını herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımnî diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. www.qiagen.com

HB-2197-002 1103449 157014158 02/2017

© 2017 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

