

Validación del Test de Screening poblacional para Cáncer de Mama y Ovario Hereditario myBRCA

Birgitte B. Simen, PhD¹ and Joseph V. Thakuria, MD²

Abstract

myBRCA es un ensayo dirigido de secuenciación de última generación (Next Generation Sequencing) para detectar mutaciones en BRCA1 y BRCA2, realizado en laboratorio clínico aprobado por CLIA Veritas Genetics. El test utiliza saliva o sangre pura y fue cuidadosamente validado en diversas muestras con variaciones de BRCA1 y BRCA2, representando ambas raras y relativamente comunes mutaciones patogénicas. Los estudios de validación mostraron que la sensibilidad y la especificidad del ensayo son ambas superiores de 99,9%.

Introducción

Mutaciones patogénicas en BRCA1 y BRCA2 aumentan dramáticamente el riesgo individual de desarrollar cáncer de mama y ovario. En muchos casos, mutaciones patogénicas en estos genes de los que se sabe su acción supresora de tumores, resultan en la producción de proteínas supresoras de tumores truncadas o no funcionales. Mutaciones patogénicas en BRCA1 o BRCA2 causan el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, y, en menor grado, también incrementa el riesgo para otros cánceres, como cáncer de próstata, cáncer pancreático y melanoma.

Veritas Genetics ha desarrollado un test clínico basado en la secuenciación de última generación para BRCA1 y BRCA2. Un extracto de ADN es procesado por amplificación múltiple con cebadores específicos, y el producto es secuenciado en el secuenciador de última generación *NextSeq 500* de Illumina. El ensayo cubre 16426 pares de bases de secuencia genética, incluyendo la completa

codificación de las regiones y sitios de empalme en BRCA1 y BRCA2. Mutaciones puntuales y pequeñas inserciones/deleciones son detectadas.

El estudio de validación fue basado en las guías de CDC, CLIA, CAP, ACMG y CLSI (1-6). Ambos tipos de muestra, sangre y saliva, fueron procesados desde el principio hasta el final. También fueron incluidas líneas celulares con mutaciones de ADN para asegurar un completo espectro de variantes de validación, pero la mayoría de las muestras fueron procesadas desde pacientes originales.

myBRCA está destinado para cualquiera que quieras conocer si posee mutaciones en BRCA1 y 2. Para finalizar, Veritas lo diseñó cuidadosamente con muestras provenientes de múltiples etnias, en lugar de simplemente asumir que la información relevante está disponible en la etapa de diseño, un punto a menudo pasado por alto en los tests de ADN. Más de la cuarta parte de las muestras de validación de sangre y saliva (27,7%) provinieron de donantes no caucásicos, incluyendo personas con ascendencia afroamericana, hispánica, del este asiático, del sur asiático y Oriente Medio.

Sobre los autores:

Dr. Birgitte Simen, quien ha diseñado el estudio de validación, co-autor de la publicación del grupo de trabajo CDC "Nature Biotechnology" *Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice*. Dr. Simen previamente encabezó el ensayo sobre Next-Generation Sequencing desarrollado en Roche.

Dr. Joseph Thakuria es una reconocida autoridad en la interpretación clínica de información genética (7). Sus logros previos incluyen ser director médico y co-investigador para el *Personal Genome Project* en *Harvard Medical School*.

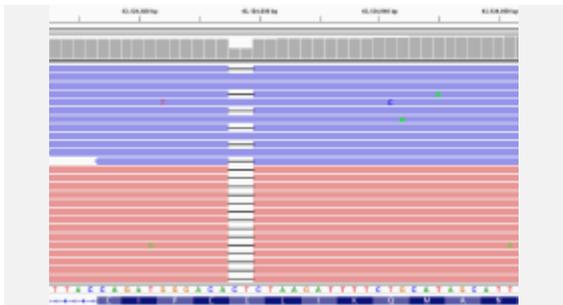
Resultados

Muestras positivas para BRCA1 y BRCA2 fueron recolectadas de mujeres quienes habían sido previamente testeadas en la clínica y actualmente están siendo monitoreadas clínicamente para el desarrollo de cáncer. 188 muestras fueron secuenciadas, incluyendo 108

¹ Veritas Genetics, Danvers, MA 01923.

² Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114

muestras positivas de saliva y sangre. El análisis fue realizado ciegamente para evitar sesgos de interpretación. Todos los casos positivos fueron patogénicos, lo que significa, que este análisis no fue amortiguado por la inclusión de polimorfismos benignos como si fueran verdaderos positivos. Se muestra debajo un ejemplo de validación de una muestra mutada.



Resultados de una muestra con una mutación en BRCA1, p.Glu23ValfsTer17, una conocida mutación patogénica, con una fracción de lectura visualizados en el Integrative Genomics Viewer (8). Colores rojo y azul indican lecturas de secuenciación hacia delante y en reversa respectivamente.

Reproductibilidad y repetición a través de múltiples intentos y diferentes operadores fueron ambas del 100%. Todas las muestras positivas resultaron con las variantes patogénicas esperadas, las que fueron confirmadas adicionalmente por secuenciación Sanger. Más de 2000 posiciones individuales en regiones que flanquean estas variaciones fueron comparadas para asegurar que las posiciones que se esperaban negativas fueran verdaderos negativos. No fueron detectados falsos negativos ni falsos positivos.

	Condition Positive (Sanger)	Condition Negative (Sanger)
Test outcome Positive (NGS)	108	0
Test outcome Negative (NGS)	0	2305

Análisis de datos

El sistema de gestión patentado del laboratorio (LIMS) y los propios lineamientos bioinformáticos son componentes muy importantes en los procesos de myBRCA. Para asegurar estas funciones de una manera segura, estas fueron validadas como es recomendado por CAP (3,4). En adición al ensayo de validación descrito arriba, Veritas creó lecturas sintéticas con índices de error realistas, códigos moleculares y variantes patogénicas para diferentes líneas de validación. También se realizaron ensayos de baja resolución para simular la baja cobertura. El 100% de las variaciones testeadas fueron detectadas bajo todas las condiciones. Finalmente, todos los polimorfismos referenciados por el *National Institute of Standards and Technology* fueron detectados en una muestra Hapmap (NA12878) que fue secuenciada como parte de la validación.

La base de datos de Veritas Genetics contiene más de 8000 variantes conocidas para BRCA1 y BRCA2. Variantes patogénicas son extensivamente curadas. En nuestros estudios de validación, la incidencia de variantes de significancia incierta (*VUS, Variants of unknown significance*) fue solamente 2,3% maximizando la información reportada para guiar el asesoramiento genético y evitar ansiedad innecesaria en los pacientes.

Conclusión

El test myBRCA está clínicamente validado, con gran precisión, en el desarrollo en laboratorio para el riesgo de cáncer de mama y ovario, cubriendo todas las regiones codificantes de BRCA1 y BRCA2 en personas con amplia variedad étnica.

Reconocimientos

Agradadamente queremos reconocer a los pacientes y voluntarios quienes desinteresadamente donaron saliva y sangre a este estudio de validación. En adición, queremos agradecer al Dr. Jan Lubinski, Profesor de Medicina y Cabeza del *International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University* en Polonia por la recolección de muestras y por participar con valoradas colaboraciones científicas con Veritas Genetics.

Referencias

1. Gargis A, Kalman L, Berry M et al. Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice. *Nature Biotechnology*, 30:1033 (2012)
2. Standards and Certification: Laboratory Requirements (42 CFR 493), www.ecfr.gov
3. Aziz N, Zhao Q, Bry L. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests. *Arch Pathol Lab Med* (2014)
4. Molecular Pathology Checklist (09.25.2012). College of American Pathologists, www.cap.org
5. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al. ACMG clinical laboratory standards for Next-generation sequencing. *Gen Med*, 15:733 (2013)
6. Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline MM17-A. Vol.28 No.9 (March 2009). Clinical and Laboratory Standards Institute
7. Thakuria JV and Murray M. Clinical Interpretation of Genomic Data, chapter in *Clinical Genomics: Practical Applications in Adult Patient Care*, American College of Physicians (ACP), Mc Graw Hill, (2014) Columbus, OH
8. Thorvaldsdóttir H1, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14:178 (2013)