

cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest

cobas[®]

FOR BRUK TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTIKK.

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Se cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) for informasjon om preparering av prøve.

TILTENKT BRUK

cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest skal primært brukes til deteksjon av BRAF V600-mutasjoner i DNA ekstrahert fra formalinfiksert, parafininnstøpt humant melanomvev og papillært thyroideakarsinomvev (PTC). Ved melanom skal den brukes som et hjelpemiddel for å velge pasienter med tumorer som er bærere av BRAF V600-mutasjoner, for behandling med enten ZELBORAF[®] (vemurafenib) alene eller med COTELLIC[®] (cobimetinib) i kombinasjon med ZELBORAF[®] (vemurafenib).

OPPSUMMERING OG FORKLARING AV TESTEN

Aktiverende mutasjoner av proto-onkogenet BRAF forekommer ved mange cancertyper hos mennesker, blant annet malignt melanom, kolorektalcancer, ovarialcancer og thyroideacancer.^{1, 2} BRAF-mutasjoner er identifisert i 40–60 % av maligne melanomer³ og i 36–46 % av papillært thyroideakarsinom.^{4, 5} BRAF-mutasjoner er også vanlige ved benigne nevi,⁶ noe som tyder på at slike mutasjoner forekommer svært tidlig. Oppdagelsen av slike somatiske mutasjoner i BRAF-genet i melanomer, PTC og andre tumorer hos mennesker har bidratt til å belyse den sentrale rollen BRAF-kinasen har i signalbaner som kontrollerer celleproliferasjon, differensiering og celledød. I normale celler inngår BRAF i en svært regulert signalbane som medierer effektene av vekstfaktorreseptorer (som EGFR) gjennom RAS, RAF, MEK og ERK. Onkogene mutasjoner i BRAF resulterer i økt kinasefunksjon, noe som fører til økende aktivitet i RAF-MEK-ERK signalveien ved fravær av de typiske vekstfaktorene.

De fleste BRAF-mutasjoner i melanomer, PTC og andre tumorer hos mennesker forekommer i kodon 600.⁷ Den dominerende mutasjonen i kodon 600 er V600E-mutasjonen (GTG > GAG). Flere dinukleotidmutasjoner som påvirker kodon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) og V600D (GTG > GAT)], er også observert sjeldnere, primært i melanomer og sjelden i andre tumorer, som ved kolorektal cancer.

cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest er en sanntids PCR-test for å detektere forekomst av V600E-mutasjonen (T1799A). cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest brukes som en “companion”-diagnostisk test for vemurafenib, et preparat som hemmer V600E-mutantversjonen av BRAF. Kliniske studier av vemurafenib hos pasienter med fremskredent melanom har vist at pasienter med en V600E-mutant tumor sannsynligvis vil ha klinisk nytte av preparatet.^{8, 9} En senere klinisk studie av cobimetinib i kombinasjon med vemurafenib hos pasienter med fremskredent melanom har vist at pasienter med enten en V600E- eller V600K-mutant tumor som detekteres av cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest, sannsynligvis vil ha klinisk nytte av denne behandlingen.^{10, 11} V600K forekommer i ca. 10–15 % av melanomprøver med BRAF V600-mutasjoner.¹²

TESTPRINSIPPER

cobas[®] 4800 BRAF V600 mutasjonstest (cobas BRAF-testen) er basert på to prosesser: (1) manuell prøvepreparering for å ekstrahere genomisk DNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev (FFPET); (2) PCR-amplifikasjon og deteksjon av mål-DNA ved bruk av et komplementært primerpar og to oligonukleotidprober merket med forskjellige fluoroforer. En probe er utformet for å detektere villtype-BRAF V600-sekvensen og én er utformet for å detektere V600E-mutasjonssekvensen. To eksterne analyseseriekontroller er inkludert, og villtypeallelet fungerer som en internkontroll for hele prosessen.

Prøvepreparering

FFPET-prøver behandles og genomisk DNA isoleres ved bruk av cobas[®] DNA Sample Preparation Kit, en manuell prøvepreparering basert på nukleinsyrebinding til glassfibre. Et deparafinisert 5 µm-snitt av en FFPET-prøve lyseres ved inkubasjon ved forhøyet temperatur med en protease og kaotropisk lyserings-/bindingsbuffer som frigjør nukleinsyrer og beskytter det frigjorte genomiske DNA fra DNaser. Deretter tilsettes isopropanol til lyseringsblandingen, som så sentrifugeres gjennom en kolonne med et glassfiberfilter. Under sentrifugering bindes det genomiske DNA til overflaten på glassfiberfilteret. Ubundne substanser, slik som salter, proteiner og andre cellulære forurensninger, fjernes under sentrifugeringen. De adsorberte nukleinsyrene vaskes og elueres deretter med en vandig løsning. Mengden genomisk DNA bestemmes spektrofotometrisk og justeres til en fast konsentrasjon som skal tilsettes amplifikasjons- og deteksjonsblandingen. Mål-DNA-et blir deretter amplifisert og detektert i cobas z 480-analysatoren ved bruk av amplifikasjons- og deteksjonsreagensene som følger med cobas BRAF-testkitet.

PCR-amplifikasjon og deteksjon

Valg av mål

cobas BRAF-testen bruker primere som definerer en 116-baseparsekvens av det humane genomiske DNA-et som inneholder BRAF-kodon 600-posisjonen i ekson 15. Hele BRAF-genet blir ikke amplifisert. cobas BRAF-testen er utformet for å detektere en 1799 T>A-substitusjon i BRAF-genet, som resulterer i en valin til glutamatsyre-substitusjon ved kodon 600 (V600E). Målspesifikke fluoroformerkede TaqMan-prober for BRAF-villtype og mutant DNA bindes til henholdsvis villtype- og mutantsekvensene. Villtype- og mutantsekvensene detekteres av dedikerte optiske kanaler for hver sekvens.

Målamplifikasjon

Thermus species Z05 DNA-polymerase brukes til målamplifikasjon. PCR-reaksjonsblandingen varmes først opp for å denaturere det genomiske DNA og eksponere primermålekvansene. Når blandingen kjøles ned, hybridiseres oppstrøms- og nedstrømsprimere til mål-DNA-sekvensene. I nærvær av divalent metallion og dNTP i overskudd forlenger Z05 DNA-polymerase hver hybridiserte primer, og en ny DNA-tråd syntetiseres. Dette avslutter den første PCR-syklusen, og gir en dobbeltrådet DNA-kopi av den 116-basepars målregionen av BRAF-genet. Denne prosessen gjentas i et bestemt antall sykluser, der hver syklus effektivt doubler mengden amplikon-DNA. Amplifikasjon skjer kun i den delen av BRAF-genet som ligger mellom primerne.

Automatisk sanntidsdeteksjon

cobas BRAF-testen anvender sanntids PCR-teknologi. Hver målspesifikke oligonukleotidprobe i reaksjonen er merket med et rapporteringsfluorofor og et slukkerfluorofor, som absorberer (slukker) fluorescensutstrålingene fra rapporteringsfluoroforet i en intakt probe. Under hver amplifikasjonssyklus bindes prober som er komplementære til den enkeltrådet DNA-sekvensen i amplikonet, og blir deretter splittet av 5' til 3'-nukleaseaktiviteten til Z05 DNA-polymerasen. Så snart rapporteringsfluoroforet er separert fra slukkerfluoroforet av denne nukleaseaktiviteten, kan fluorescens med en karakteristisk bølgelengde måles når rapporteringsfluoroforet eksiteres av riktig lysspektrum. To ulike rapporteringsfluoroforer brukes til å merke den målspesifikke BRAF villtypeproben (WT) og BRAF V600E-mutasjonsproben. Amplifikasjon av de to BRAF-sekvensene kan detekteres uavhengig i en enkelt reaksjonsbrønn ved å måle fluorescensen ved de to karakteristiske bølgelengdene i dedikerte optiske kanaler.

Selektiv amplifikasjon

Selektiv amplifikasjon av målnukleinsyre fra prøven oppnås i **cobas** BRAF-testen ved bruk av AmpErase-enzymet (uracil-N-glykosylase) og deoksyuridintrifosfat (dUTP).¹³ AmpErase-enzymet gjenkjenner og katalyserer destruksjon av DNA-tråder som inneholder deoksyuridin, men ikke DNA som inneholder tymidin. Deoksyuridin finnes ikke i naturlig forekommende DNA, men finnes alltid i amplikon på grunn av bruken av dUTP som en av nukleotidtrifosfatene i Reaksjonsmiks-reagenset. Det er derfor kun amplikon som inneholder deoksyuridin. Deoksyuridin gjør kontaminerende amplikon mottakelig for destruksjon ved hjelp av AmpErase-enzymet forut for amplifikasjon av mål-DNA. AmpErase-enzymet, som inngår i Reaksjonsmiks-reagenset, katalyserer splittingen av DNA som inneholder deoksyuridin, ved å splitte deoksyuridiningruppens deoksyribosekjede ved C1-posisjonen. Ved temperaturøkning i det første varmetrinnet ved alkalisk pH brytes amplikon-DNA-kjeden der deoksyuridinet finnes, noe som igjen fører til at DNA ikke lenger er amplifiserbart. AmpErase-enzymet er inaktivt ved temperaturer over 55 °C, dvs. gjennom alle termosykliske trinn, og derfor blir ikke målamplikon ødelagt.

REAGENSER

cobas® 4800 BRAF V600 mutasjonstest (BRAF) 24 tester (M/N: 05985595190)			
Komponenter i kitet	Reagensingredienser	Antall per kit	Sikkerhetssymbol og advarsel^a
RXNMIX (Reaksjonsmik)	Trisinbuffer Kaliumacetat Kaliumhydroksid Glyserol Tween 20 EDTA 5 % dimetylsulfoksid < 0,09 % dNTPs < 0,10 % Z05 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,10 % AmpErase (uracil-N-glykosylase) enzym (mikrobiell) < 0,003 % oligonukleotidaptamer 0,08 % natriumazid	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (Magnesiumacetat)	Magnesiumacetat 0,09 % natriumazid	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (BRAF Oligo Mix)	Tris-HCl-buffer EDTA 0,09 % natriumazid Poly rA RNA (syntetisk) < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms BRAF-primere < 0,01 % fluoroformerkede BRAF-prober	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (BRAF mutantkontroll)	Tris-HCl-buffer EDTA Poly rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobielt) som inneholder BRAF mutantsekvenser < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobielt) som inneholder BRAF villtypesekvenser	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (BRAF villtypekontroll)	Tris-HCl-buffer EDTA Poly rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobielt) som inneholder BRAF villtypesekvenser	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (DNA-fortynningsløsning)	Tris-HCl-buffer 0,09 % natriumazid	2 × 1 ml	N/A

^a Merking av produktsikkerhet følger primært EUs GHS-retningslinjer.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

A. FOR BRUK TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTIKK.

- B. Denne testen skal brukes med formalinfikserte, parafininnstøpte vevsprøver.
- C. Ikke pipetter med munnen.
- D. Ikke spis, drikk eller røyk i laboratoriets arbeidsområder.
- E. Unngå mikrobiell kontaminering og DNA-kontaminering av reagenser.
- F. Kast ubrukte reagenser og avfall i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk.
- G. Kit må ikke brukes etter utløpsdatoen.
- H. Reagenser fra ulike kit eller lot må ikke slås sammen.
- I. Sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig fra ditt lokale Roche kontor etter forespørsel.
- J. Hansker må brukes, og de må byttes mellom håndtering av prøver og **cobas**[®] 4800-reagenser for å unngå kontaminasjon.
- K. For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal amplifikasjon og deteksjon utføres i et annet område enn der det utføres DNA-isolering. Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. For å sikre tilstrekkelig rengjøring skal alle overflater, inkludert stativ og pipetter, tørkes grundig med en 0,5 % natriumhypoklorittløsning* og deretter med en 70 % etanolløsning.
*** MERK: Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortyning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.**
- L. Prøver må håndteres som potensielt infeksiose, og sikre laboratorierutiner må følges. Disse er beskrevet i *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ og i CLSI-dokumentet M29-A4.¹⁵
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT, og DNA SD** inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberørr og danne svært eksplosive metallazider. Hvis løsninger som inneholder natriumazid, helles ned i avløp i laboratoriet, må de skylles ned med store mengder kaldt vann for å unngå opphopning av azider.
- N. Bruk vernebriller, laboratoriefrakk og engangshansker ved håndtering av reagenser. Unngå kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Skyll umiddelbart med store mengder vann hvis slik kontakt oppstår. Hvis kontaktstedet ikke blir behandlet, kan det oppstå brannskade. Fortynn med vann før du tørker opp eventuelt søl.
- O. Alt forbruksmaterieell er laget for bare å brukes én gang. Skal ikke gjenbrukes.
- P. Bruk ikke forbruksmaterieell etter utløpsdato.
- Q. Bruk ikke natriumhypoklorittløsning (klormiddel) til å rengjøre **cobas z** 480-analysatoren. Rengjør **cobas z** 480-analysatoren i samsvar med prosedyrene som er beskrevet i operatørmanualen for **cobas**[®] 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**[®] 4800-systemet.
- R. For ytterligere advarsler, forholdsregler og prosedyrer for å redusere risikoen for kontaminasjon av **cobas z** 480-analysatoren henvises det til operatørmanualen for **cobas**[®] 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**[®] 4800-systemet.
- S. Bruk av sterile engangspipetter og DNase-frie pipettespisser anbefales.

OPPBEVARING OG HÅNDTERING

- A. Ikke frys reagenser.
- B. Oppbevar **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT, og DNA SD** ved 2–8 °C. Når disse reagensene er åpnet, er de stabile for bruk opptil 4 ganger over 60 dager eller til utløpsdato, avhengig av hva som kommer først.
- C. **BRAF OM** og Working Master Mix (tillages ved tilsetning av **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**) skal beskyttes mot langvarig eksponering for lys.
- D. Working Master Mix (tillages ved tilsetning av **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**) skal oppbevares ved 2–8 °C på et mørkt sted. Preparerte prøver og kontroller må tilsettes innen 1 time fra tidspunktet Working Master Mix ble tillaget.
- E. Behandlede prøver (ekstrahert DNA) er stabile i inntil 24 timer ved 15 °C til 30 °C eller opptil 14 dager ved 2 °C til 8 °C eller opptil 60 dager ved –15 °C til –25 °C eller etter 3 fryse-tine-sykluser når de oppbevares ved –15 °C til –25 °C. Ekstrahert DNA skal amplifiseres innen anbefalte oppbevaringsperioder eller før utløpsdatoen for **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit som brukes til å ekstrahere DNA, avhengig av hva som kommer først.
- F. Amplifikasjon må startes innen 1 time fra det tidspunktet de behandlede prøvene og kontrollene er tilsatt i Working Master Mix (tillages ved å tilsette **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**).

MATERIELL SOM MEDFØLGER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test
(M/N: 05985595190)

BRAF

24 tester

RXNMIX

(Reaksjonsmiks) (lokk med naturhvitt merke)

MGAC

(Magnesiumacetat) (lokk med gult merke)

BRAF OM

(BRAF Oligo Mix) (svart lokk med hvitt merke)

BRAF MUT

(BRAF mutantkontroll) (lokk med rødt merke)

BRAF WT

(BRAF villtypekontroll) (lokk med blått merke)

DNA SD

(DNA fortynningsløsning) (lokk med purpurrødt merke)

MATERIELL SOM KREVES, MEN SOM IKKE MEDFØLGER

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
- Mikrobrønnplate (AD-plate) og forseglingsfilm for **cobas®** 4800-systemet (Roche M/N: 05232724001)
- Justerbare pipetter*: (kapasitet 10 µl, 20 µl, 200 µl og 1000 µl) med aerosolbarriere eller nøyaktige DNase-fri spisser
- Mikrosentrifugerør med låsbart lokk (1,5 ml sterile, RNase/DNase-frie, PCR-kvalitet) (forskjellige leverandører)
- Spektrofotometer for måling av DNA-konsentrasjon**
- Vortexmikser**
- Stativer for mikrosentrifugerør
- Engangshansker, uten pudder
- Fryser med mulighet for oppbevaring i -25 °C til -15 °C

* Pipettene må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner og ha en nøyaktighet innenfor 3 % av angitt volum. Aerosolbarriere- eller "positive displacement" DNase-frie spisser må brukes der dette er angitt for å hindre krysskontaminering av prøver og amplicon.

** Alt utstyr må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner.

Instrumentering og programvare

- **cobas z** 480-analysator
- **cobas®** 4800 SR2-systemets kontrollenhet med Windows XP-bilde
- **cobas®** 4800 SR2-systemets programvareversjon 2.0 eller høyere
- BRAF-analyseringspakke, programvareversjon 1.0 eller høyere
- Strekkodeleser (Roche M/N: 05339910001)
- Skriver HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

TAKING, TRANSPORT OG OPPBEVARING AV PRØVER

MERK: Alle prøver må behandles som om de er potensielt smittebærende.

A. Prøvetaking

FFPET-prøver er validert for bruk med **cobas** BRAF-testen.

B. Transport av prøver

FFPET-prøver kan transporteres ved 15–30 °C. Transport av FFPET-prøver må skje i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk for transport av biologisk materiale.¹⁶

C. Prøveoppbevaring

Stabiliteten til FFPET-prøver som oppbevares ved 15–30 °C i inntil 12 måneder etter prøvetakingsdatoen, er bekreftet. 5 µm FFPET-snitt montert på objektglass kan oppbevares ved 15–30 °C i opptil 60 dager.

BRUKSANVISNING

MERK: Alle reagenser unntatt RXNMIX, MGAC og BRAF OM må ha romtemperatur før bruk. RXN MIX, MGAC og BRAF OM kan tas direkte fra kjølelagring på 2–8 °C for å tillage Working Master Mix.

MERK: Kun melanom- og PTC-FFPET-snitt med en tykkelse på 5 µm som inneholder minst 50 % tumorceller, skal brukes i cobas BRAF-testen. Prøver som inneholder mindre enn 50 % tumorceller, skal makrodissikeres etter deparafinering.

MERK: Se operatørmanualen for cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet for en detaljert bruksanvisning for cobas z 480-analysatoren.

Størrelse på analyseserier

cobas BRAF-testkitet er utformet for å kjøre fra minst 3 prøver pluss kontroller opptil maks. 24 prøver pluss kontroller. Det er mulig å kjøre færre enn 3 prøver pluss kontroller av gangen, men dette kan føre til utilstrekkelig reagensvolum til å kunne kjøre til sammen 24 prøver pluss kontroller med kitet. **cobas** BRAF-testen inneholder tilstrekkelig med reagenser til 8 analyseserier av 3 prøver pluss kontroller. Ett replikat av mutantkontrollen for **cobas** BRAF-testen [**BRAF MUT**] og ett replikat av villtypekontrollen for **cobas** BRAF-testen [**BRAF WT**] er påkrevd for hver analyseserie (se avsnittet "Kvalitetskontroll").

Arbeidsflyt

MERK: cobas BRAF-testen kan brukes for opptil 24 prøver i en analyseserie.

MERK: For å maksimere reagensbruken bør en analyseserie inkludere minst tre (3) pasientprøver pluss kontroller.

DNA-isolering

DNA isoleres fra FFPET-prøver ved bruk av **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N: 05985536190).

Makrodisseksjon

Hvis prøven har mindre enn 50 % tumorinnhold per område, må prøven makrodissekeres som en del av prøveprepareringen.

DNA-quantitering

MERK: Måling av DNA-konsentrasjonen skal utføres straks etter prosedyren for DNA-isolering, og før oppbevaring.

- Bland hvert DNA-konsentrat ved å vortexe i 5 sekunder før kvantitering.
- Kvantiter DNA ved hjelp av et spektrofotometer i samsvar med produsentens protokoll. Bruk **DNA EB** som følger med **cobas**® DNA Sample Preparation Kit som blank for instrumentet. Et gjennomsnitt av 2 konsistente avlesninger er påkrevd. De to målingene skal være innenfor ± 10 % av hverandre når de avleste DNA-konsentrasjonene er $\geq 20,0$ ng/µl. For avleste DNA-konsentrasjoner $< 20,0$ ng/µl skal de to målingene være innenfor $\pm 2,0$ ng/µl.
- Konsentrasjonen til DNA-konsentratet må være ≥ 5 ng/µl for at **cobas** BRAF-testen skal kunne utføres.

MERK: Hvert DNA-konsentrat må ha en minimumskonsentrasjon på 5 ng/µl for at cobas BRAF-testen skal kunne utføres. Hvis konsentrasjonen av et DNA-konsentrat er < 5 ng/µl, skal prosedyrene for deparafinering, DNA-isolering og DNA-quantitering gjentas for den aktuelle prøven ved bruk av to FFPET-snitt på 5 µm. Når det gjelder monterte prøver, etter deparafinering, skal vevet fra begge snittene kombineres i ett rør og nedsenkes i TLB og PK fra cobas® DNA Sample Preparation Kit. Utfør DNA-isolering og -quantitering. For umonterte prøver kombinerer du vevet fra begge seksjoner i ett rør og utfører avparafinering, DNA-isolasjon og kvantitering. Hvis DNA-konsentratet fortsatt er < 5 ng/µl, bestill et annet FFPET-prøvesnitt fra det henvisende sykehuset.

MERK: Behandlede prøver (ekstrahert DNA) er stabile i inntil 24 timer ved 15 °C til 30 °C eller opptil 14 dager ved 2 °C til 8 °C eller opptil 60 dager ved –15 °C til –25 °C eller etter 3 fryse-tine-sykluser når de oppbevares ved –15 °C til –25 °C. Ekstrahert DNA skal amplifiseres innen anbefalte oppbevaringsperioder eller før utløpsdatoen for cobas® DNA Sample Preparation Kit som brukes til å ekstrahere DNA, avhengig av hva som kommer først.

AMPLIFIKASJON OG DETEKSJON

MERK: For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal amplifikasjon og deteksjon utføres i et annet område enn der det utføres DNA-isolering. Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. For å sikre tilstrekkelig rengjøring skal alle overflater, inkludert stativ og pipetter, tørkes grundig med en 0,5 % natriumhypoklorittløsning og deretter med en 70 % etanolløsning. Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortykning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.

Klargjøring av instrumentet:

Se **cobas**[®] 4800-systemets brukerhåndbok eller **cobas**[®] 4800-systemets brukerhjelp for mer informasjon om oppsett av **cobas z** 480-analysatoren.

Klargjøring av testrekkefølge:

Se **cobas**[®] 4800-systemets brukerhåndbok eller **cobas**[®] 4800-systemets brukerhjelp for mer informasjon om trinnene i **cobas** BRAF-arbeidsflyten.

Fortynningsberegning av prøve-DNA-konsentrat:

Kun én amplifikasjon/deteksjon kjøres per prøve, og det benyttes 25 µl av en 5 ng/µl-fortynning av DNA-konsentratet (125 ng totalt). Instruksjonene nedenfor beskriver tillaging av minst 35 µl fortynnet DNA-konsentrat på 5 ng/µl, avhengig av den initielle DNA-konsentratskonsentrasjonen. Dette vil sikre at hver prøve bruker minst 5 µl med DNA-konsentrat, for å hindre variasjon som kan oppstå ved pipettering av mindre prøvevolumer.

Fortynningsberegning av prøve-DNA-konsentrat ved konsentrasjoner fra 5 ng/µl til 35 ng/µl

MERK: DNA-konsentrater fra prøver skal fortynnes like før amplifikasjon og deteksjon.

MERK: Kun én amplifikasjon/deteksjon kjøres per prøve, og det benyttes 25 µl av en 5 ng/µl-fortynning av DNA-konsentratet (125 ng totalt).

- A. For hver prøve bestemmer du hvor mye DNA-konsentrat som trengs, ved å bruke følgende formel:
Volum av DNA-konsentrat som trengs = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) / \text{Konsentrasjon til DNA-konsentrat i ng/µl}$
- B. For hver prøve, bestem hvor mye DNA-fortynningsløsning (**DNA SD**) som trengs, ved å bruke følgende formel:
Volum av DNA SD som trengs i µl = $(35 \text{ µl} - \text{volum av DNA-konsentrat som trengs i µl})$.

Eksempel:

Konsentrasjon til DNA-konsentratet = 21 ng/µl

A. Volum av DNA-konsentrat som trengs = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) / 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$

B. Volum av DNA SD som trengs i µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Fortynningsberegning av prøve-DNA-konsentrat ved konsentrasjoner > 35 ng/µl

MERK: DNA-konsentrater fra prøver skal fortynnes like før amplifikasjon og deteksjon.

MERK: Kun én amplifikasjon/deteksjon kjøres per prøve, og det benyttes 25 µl av en 5 ng/µl-fortynning av DNA-konsentratet (125 ng totalt).

- A. Ved konsentrasjoner til DNA-konsentrater > 35 ng/µl, bruk følgende formel for å beregne hvor mye DNA-fortynningsløsning (**DNA SD**) som trengs for å tillage minst 35 µl fortynnet DNA-konsentrat. Dette er for å sikre at hver prøve bruker minst 5 µl av DNA-konsentrat.

Volum av DNA SD som trengs i µl = $((5 \text{ µl DNA-konsentrat} \times \text{konsentrasjon til DNA-konsentrat i ng/µl}) / (5 \text{ ng/µl})) - 5 \text{ µl}$

- B. Bruk det beregnede volumet av **DNA SD** til å fortynne 5 µl av DNA-konsentrat.

Eksempel:

Konsentrasjon til DNA-konsentratet = 42 ng/µl

A. Volum av DNA SD som trengs i µl = $((5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) / (5 \text{ ng/µl})) - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$

B. Bruk det beregnede volumet av **DNA SD** til å fortynne 5 µl av DNA-konsentrat.

Prøvefortynning

- A. Klargjør riktig antall med 1,5 ml mikrosentrifugerør for prøve-DNA-konsentratfortynninger ved å merke dem med riktig prøveidentifikasjon i området for tilsetning av prøver.
- B. Bruk en pipette med aerosolbarrierespiss og pipetter det beregnede volumet av DNA-fortynningsløsning (**DNA SD**) i hvert merkede prøverør.
- C. Vortex hvert prøve-DNA-konsentrat i 10 sekunder.
- D. Bruk en pipette med aerosolbarrierespiss og pipetter det beregnede volumet av hvert prøve-DNA-konsentrat forsiktig i riktig merket rør med **DNA SD**. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve.

- E. Sett på hette, og bland hver prøve fortynnet med DNA-konsentrat ved å vortexe i 10 sekunder.
 F. Bytt hansker.

Tillaging av Working Master Mix (MMX)

MERK: BRAF Oligo Mix og Working Master Mix er lysfølsomme. Alle åpne blandinger av BRAF OM og Working Master Mix skal beskyttes mot langvarig eksponering for lys.

- A. Beregn volumet av **RXNMIX** som trengs, ved å bruke følgende formel:
 Volum av **RXNMIX** som trengs = (antall prøver + 2 kontroller + 1) × 10 µl
- B. Beregn volumet av **BRAF OM** som trengs, ved å bruke følgende formel:
 Volum av **BRAF OM** som trengs = (antall prøver + 2 kontroller + 1) × 8 µl
- C. Beregn volumet av **MGAC** som trengs, ved å bruke følgende formel:
 Volum av **MGAC** som trengs = (antall prøver + 2 kontroller + 1) × 7 µl
- Tabell 1 kan brukes for å bestemme volumer av hvert reagens som trengs for tillaging av Working Master Mix, basert på antall prøver i analyseserien.

Tabell 1

		Reagensvolumer som trengs for Working Master Mix									
		Antall prøver*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µl	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µl	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Totalt volum µl		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Antall prøver + 2 kontroller + 1

- D. Ta ut riktig antall **RXNMIX**, **BRAF OM** og **MGAC**-flasker fra kjølelageringen på 2–8 °C. Vortex hvert reagens i 5 sekunder for å samle væsken i bunnen av røret før bruk. Merk et sterilt mikrosentrifugerør for Working Master Mix (MMX).
- E. Tilsett beregnet volum av **RXNMIX** til det merkede MMX-røret.
- F. Tilsett beregnet volum av **BRAF OM** til det merkede MMX-røret.
- G. Tilsett beregnet volum av **MGAC** til det merkede MMX-røret.
- H. Vortex røret i 5 sekunder for å sikre tilstrekkelig blanding.

MERK: Bruk kun mikrobrønnplate (AD-plate) og forseglingsfilm for cobas® 4800-systemet (Roche M/N: 05232724001).

- I. Tilsett forsiktig 25 µl Working Master Mix til hver reaksjonsbrønn som trengs for analyseserien i AD-platen. Ikke la pipettespissen berøre platen utenfor den aktuelle brønnen.

Tilsetning av kontroller og prøver:

- A. Tilsett 25 µl **BRAF MUT**-kontroll til brønn **A01** på AD-platen, og bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.
- B. Bruk en ny pipettespiss og tilsett 25 µl **BRAF WT**-kontroll til brønn **B01** på AD-platen, og bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.

MERK: Hver analyseserie må inneholde både en BRAF MUT-kontroll i posisjon A01 og en BRAF WT-kontroll i posisjon B01, ellers blir analyseserien gjort ugyldig av cobas z 480-analysatoren.

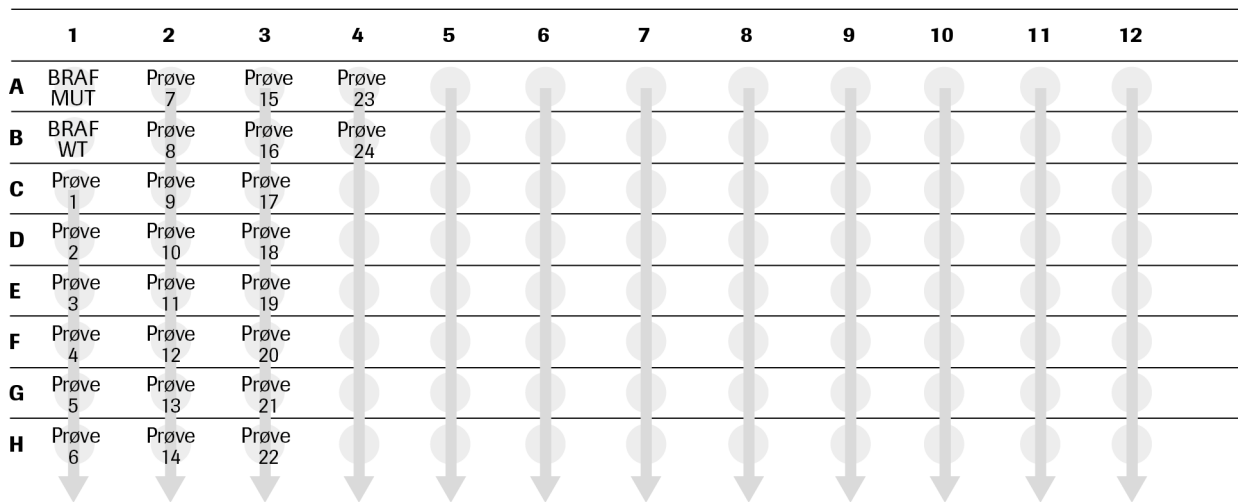
MERK: Bytt hansker ved behov for å forebygge kontaminasjon fra prøve til prøve og kontaminasjon av utsiden av PCR-reaksjonsrøret.

- C. Bruk en pipette med aerosolbarrierespiss, og tilsett 25 µl fortynnet prøve-DNA i den riktige brønnen som inneholder Working Master Mix. Start fra posisjon **C01** på mikrobrønnplaten (AD-platen), i samsvar med malen i Figur 1 under. Bland innholdet i brønnen ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger. Sørg for at all væske er samlet i bunnen av brønnen.

MERK: Prøve-DNA og kontroller skal tilsettes AD-platen innen 1 time etter tillaging av Working Master Mix (MMX).

Figur 1

Oppsett av prøveplate



- D. Fortsett til alle testprøver er tilsatt i AD-platen.
- E. Dekk AD-platen med forseglingsfilmen (leveres med platene). Bruk forseglingsfilmapplikatoren for å sikre at forseglingsfilmen fester seg godt til AD-platen.
- F. Kontroller at all væske er samlet i bunnen av hver brønn før du starter amplifikasjon og deteksjon.

MERK: Amplifikasjon og deteksjon skal startes innen 1 time etter at prøve-DNA og kontroller ble tilsatt i Working Master Mix.

Starte PCR

Se operatørmanualen for **cobas**[®] 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**[®] 4800-systemet for detaljerte instruksjoner om trinnene i BRAF-arbeidsflyten.

Tolkning av resultater

MERK: All analyseserie- og prøvevalidering utføres av cobas[®] 4800 BRAF AP-programvaren.

MERK: En gyldig analyseserie kan omfatte både gyldige og ugyldige prøveresultater.

Prøveresultater fra en gyldig analyseserie tolkes som vist i Tabell 2.

Tabell 2
Tolkning av prøveresultater

Resultat av cobas BRAF-testen	Tolkning
Mutation Detected	V600-mutasjon detektert i BRAF-kodon 600-posisjonen i ekson 15
Mutation Not Detected eller No Mutation Detected*	V600-mutasjon ikke detektert i BRAF-kodon 600-posisjonen i ekson 15
Invalid	Resultatet er ugyldig. Gjenta testing av prøver med ugyldige resultater i samsvar med instruksjonene i avsnittet Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater under.
Failed	Mislykket grunnet feil ved maskinvare eller programvare

* Et Mutation Not Detected- eller No Mutation Detected-resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon i BRAF-kodon 600-posisjonen, fordi resultatene avhenger av antall mutantsekvenskopier som er til stede i prøven, og kan påvirkes av prøvens integritet, mengden isolert DNA og tilstedeværelse av interfererende substanser.

Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater

- A. Gjenta fortytning av det ugyldige prøve-DNA-konsentratet ved å starte med prosedyrene **Kalkulering av fortytning av prøve-DNA-konsentrat** og **Prøvefortynning** i avsnittet **AMPLIFIKASJON OG DETEKSJON**.

Merk: Hvis det ikke er nok prøve-DNA-stamløsning til å utføre en ny fortytning av DNA-stamløsningen, må det innhentes en ny 5 µm seksjon av vev og re-isolert DNA ved hjelp av **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)**. Fortsett deretter med trinn B nedenfor.

- B. Etter DNA-konsentratfortynning til 5 ng/µl som beskrevet i **Prøvefortynning**, utføres en ytterligere 1:2-fortynning ved å ta 20 µl av fortynt DNA-konsentrat og tilsette 20 µl DNA-prøvefortynningsløsning (**DNA SD**).

- C. Fortsett med prosedyren **Tillaging av Working Master Mix (MMX)** og resten av prosedyren for amplifikasjon og deteksjon.

Merk: Hvis prøven forblir ugyldig etter ny testing ved en 1:2-fortynning, må du gjenta hele testprosedyren for prøven. Start med DNA-isolering ved hjelp av **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** ved hjelp av en ny 5 µm FFPE-seksjon. Standardmengden på 25 µl med DNA ved 5 ng/µl (uten ytterligere fortytning) skal brukes til amplifikasjon og deteksjon.

KVALITETSKONTROLL

Mutantkontrollen (**BRAF MUT**) og villtypekontrollen (**BRAF WT**) for **cobas** BRAF-testen er inkludert i hver analyseserie. En analyseserie er gyldig hvis både brønnen med **BRAF MUT**-kontroll (**A01**) og brønnen med **BRAF WT**-kontroll (**B01**) har gyldig kontrollstatus. Hvis enten **BRAF MUT**-kontrollen eller **BRAF WT**-kontrollen er ugyldig, må analyseserien gjentas. Klargjør en fersk fortytning av den tidligere isolerte prøve-DNA-konsentratet, for å sette opp en ny AD-plate med kontroller for amplifikasjon og deteksjon.

BRAF mutantkontroll

Resultatet av **BRAF MUT**-kontrollen må være "Valid". Hvis resultatene av **BRAF MUT**-kontrollen konsekvent er ugyldige, kontakt ditt lokale Roche-kontor for teknisk assistanse.

BRAF villtypekontroll

Resultatet av **BRAF WT**-kontrollen må være "Valid". Hvis resultatene av **BRAF WT**-kontrollen konsekvent er ugyldige, kontakt ditt lokale Roche-kontor for teknisk assistanse.

FORSIKTIGHETSREGLER

Som for andre laboratorieprosedyrer er god laboratorieteknikk essensielt for å sikre optimal ytelse for denne analysen. På grunn av den høye analytiske sensitiviteten til PCR-baserte tester må det utvises aktsomhet for å sikre at reagenser og amplifikasjonsblandinger ikke kontamineres.

TESTENS BEGRENSNINGER

1. Test kun de angitte prøvematerialene. **cobas** BRAF-testen er bare validert for bruk med melanom- og PTC-FFPET-prøver.
2. **cobas** BRAF Test er validert bare ved hjelp av **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)** for å ekstrahere genomisk DNA.
3. Deteksjon av en mutasjon er avhengig av antallet mutantsekvenskopier som er til stede i prøven, og kan påvirkes av prøvens integritet, mengden isolert DNA og tilstedeværelse av interfererende substanser.
4. Pålitelige resultater er avhengig av adekvat prøvefiksering, transport, oppbevaring og håndtering. Følg prosedyrene i dette pakningsvedlegget og i operatørmanualen for **cobas[®] 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas[®] 4800**-systemet.
5. Tilsetning av AmpErase-enzym i **cobas** BRAF-testens reaksjonsmiks muliggjør selektiv amplifikasjon av mål-DNA. Kontaminering av reagensene kan imidlertid bare unngås gjennom gode laboratorierutiner og ved å følge prosedyrene som er spesifisert i dette pakningsvedlegget nøye.
6. Dette produktet må kun brukes av personell som har fått opplæring i PCR-teknikker og i bruken av **cobas[®] 4800**-systemet.
7. Dette produktet er kun validert for bruk med **cobas[®] 4800**-systemet. Ingen andre PCR-systemer er validert for bruk med dette produktet.
8. På grunn av iboende forskjeller mellom teknologier anbefales det at brukerne utfører metodekorrelasjonsstudier i laboratoriet for å bestemme de teknologiske forskjellene før en ny teknologi tas i bruk.
9. Effekten av andre mulige variabler, som prøvefikseringsvariabler, er ikke evaluert.
10. Selv om det er sjelden, kan mutasjoner og varianter innenfor regionene av BRAF-genet som **cobas** BRAF-testens primære og prober er rettet mot, resultere i manglende evne til å amplifisere BRAF V600-allelet eller detektere forekomst av mutasjon i kodon 600.
11. Tilstedeværelsen av PCR-hemmere kan føre til falske negative eller ugyldige resultater.
12. Melanin er en kjent hemmer av PCR-reaksjoner. DNA-prøveprepareringskitet fjerner melanin fra prøven under ekstraksjon, men melanin i en prøve kan likevel føre til ugyldige resultater. Hvis det er mistanke om melanin-hemming, anbefales det å gjenta testen ved å bruke en 1:2-fortynning, som beskrevet i "Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater".
13. **cobas** 4800 BRAF V600 mutasjonstesten viser begrenset kryssreaktivitet med ikke-V600E-mutantprøver (V600K, V600D og V600E2). Se avsnittet "Melanom – Evaluering av analytisk ytelse" for mer informasjon.
14. FFPE-prøver som inneholder forringet DNA, kan svekke testens evne til å detektere mutasjonen.
15. **cobas** 4800 BRAF mutasjonstesten er en kvalitativ test. Testen er ikke ment for kvantitativ måling av mutasjon.

I. MELANOM

EVALUERING AV ANALYTISK YTELSE

For de analytiske studiene som beskrives nedenfor, ble prosentvis tumorinnhold vurdert med patologigranskning, og melanininnholdet ble vurdert med patologigranskning og en intern melaninbestemmelsesanalyse. Bidireksjonal Sanger-sekvensering ble brukt for å velge ut prøver for testing. Prosentvis mutasjonsnivå ble bestemt ved bruk av 454-sekvensering (kvantitativ, massiv parallell pyrosekvenseringsmetode).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet – Deteksjonsgrense (LoD)

Den minste mengden med innmatet DNA som gir korrekte resultater 95 % av tiden, ble vurdert ved bruk av fortynningspaneler som ble fremstilt av tre typer prøver:

- Prøveblandinger som var fremstilt ved å blande DNA-konsentrater fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver og BRAF villtype FFPET-prøver, for å oppnå spesifikke mutasjonsnivåer.
- Individuelle FFPET DNA-konsentrater fremstilt fra tre BRAF V600E-mutante FFPET-prøver.
- Cellelinjeblandinger fremstilt ved å blande DNA-konsentrater fra en BRAF V600E-mutant cellelinje og en BRAF villtype-cellelinje.

Alle prøver brukt i denne studien ble sekvensert med 454-sekvensering for å fastslå den prosentvise mutasjonen i hver prøve.

Analytisk sensitivitet ved bruk av prøveblandinger

DNA-konsentrater fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver ble blandet med DNA-konsentrater fra BRAF villtype FFPET-prøver for å danne én prøve med mutasjonsnivå ~10 %, tre prøver med mutasjonsnivå ~5 %, én prøve med mutasjonsnivå ~3 %. Én BRAF villtypeprøve ble også testet. Etter blanding ble mutasjonsnivåene verifisert med 454-sekvensering. Hver av de fem prøveblandingene med V600E-mutasjon (men ikke villtypeprøven) ble deretter fortynnet for å danne panelprøvene som er beskrevet i Tabell 3.

Tabell 3
Tillaging av fortynningspanelprøver fra prøveblandinger

Blanding	Gjennomsnittlig % mutasjon*	Mengde DNA i fortynningspanelprøver (ng/25 µl)**
10 % blanding	9 % (n = 6)	125, 62,5, 31,3
5 % blanding 1	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5 % blanding 2	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5 % blanding 3	6 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
2,5 % blanding	3 % (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0 % (kun villtype)	- - -	125

* Gjennomsnittlig prosentvis mutasjon av blandingen, testet med 454-sekvensering.

** Mengde genomisk DNA i hver panelprøve. 25 µl er prøveinnmatingsvolumet for testen.

Åtte (8) replikater av hver panelprøve ble analysert ved bruk av 3 kitlot for **cobas** BRAF-testen (n = 24/panelprøve). Tabell 4 viser sensitiviteten for hver FFPET-blanding, som ble bestemt med den laveste DNA-mengden som gav en BRAF V600E "Mutation Detected"-rate på minst 95 % (skyggelegte rader).

Tabell 4
Sensitivitet for cobas BRAF-testen ved bruk av FFPET-blandinger

FFPET-blanding	Prosentvis mutasjon ved 454-sekvensering	Mengde DNA i panelprøven	"Mutation Detected"-rate (n = 24)
10 % FFPET-blanding	9 %	125 ng/25 µl	100 %
		62,5 ng/25 µl	100 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
5 % FFPET-blanding 1	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	75 %
		0,6 ng/25 µl	88 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
5 % FFPET-blanding 2	5 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	92 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	96 %
		0,6 ng/25 µl	58 %
		0,3 ng/25 µl	50 %
5 % FFPET-blanding 3	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	100 %
		0,6 ng/25 µl	96 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
2,5 % FFPET-blanding	3 %	125 ng/25 µl	0 %
		62,5 ng/25 µl	4 %
		31,3 ng/25 µl	4 %
0 % (villtype)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Denne studien viser at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutasjonen ved et mutasjonsnivå på ≥ 5 % ved bruk av standardinnmating på 125 ng/25 µl. Testens evne til å detektere mutasjonen ved lavere DNA-innmatingsnivåer viser at prøver kan inneholde forringet DNA fra fikseringsprosessen og allikevel detektere mutasjonen. Alle testresultater som ble oppnådd for BRAF villtypeprøven, var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet ved bruk av FFPET-prøver

For å bekrefte den hevdede 5 % mutasjonsdeteksjonen i pasientprøver ble 48 individuelle 5-µm-snitt fra hver av 3 BRAF V600E-mutante FFPET-prøver som inneholdt mutasjonsnivåer på 6 %, 12 % og 4 %, behandlet individuelt ved bruk av 3 lot med **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit for å isolere DNA. For å vurdere virkningen av melanin på analysen, hadde én prøve (6 % mutasjon) en høy melaninkonsentrasjon. Seriefortynninger av DNA fra hvert snitt ble preparert for å danne et sett med 6 panelprøver, som beskrevet i Tabell 5.

Tabell 5
Tillaging av fortynningspanelprøver fra FFPET-prøver

FFPET-prøve	Prøveinformasjon		Mengde DNA i fortynningspanelprøver (ng/25 µl)
	Gjennomsnittlig % V600E-mutasjon*	Pigmentering	
Prøve 1	6 %	Svært pigmentert**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Prøve 2	12 %	NHP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Prøve 3	4 %	NHP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* Gjennomsnittlig prosentvis mutasjon for prøven, bestemt med 454-sekvensering.

** Svært pigmentert basert på visuell vurdering, melaninkonsentrasjon = 0,17 µg/25 µl.

*** NHP = Ikke svært pigmentert basert på visuell vurdering.

Seksten (16) replikater av hver panelprøve ble analysert ved bruk av 3 kitlot for **cobas** BRAF-testen (n = 48/panelprøve). Sensitiviteten for hver FFPET-blanding ble bestemt med den laveste DNA-mengden som gav en BRAF V600E "Mutation Detected"-rate på minst 95 % (skyggelagte rader). Resultatene fra denne studien er vist i Tabell 6.

Tabell 6
Sensitivitet for cobas BRAF-test ved bruk av FFPET-prøver

FFPET-prøve	Prosentvis mutasjon ved 454-sekvensering	Mengde DNA i panelprøven	"Mutation Detected"-rate (n = 48)
Prøve 1	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		15,6 ng/25 µl	100 %
		7,8 ng/25 µl	98 %
		3,9 ng/25 µl	98 %
		2,0 ng/25 µl	81 %
		1,0 ng/25 µl	71 %
Prøve 2	12 %	125 ng/25 µl	100 %
		7,8 ng/25 µl	100 %
		3,9 ng/25 µl	100 %
		2,0 ng/25 µl	98 %
		1,0 ng/25 µl	98 %
		0,5 ng/25 µl	94 %
Prøve 3	4 %	125 ng/25 µl	98 %
		31,3 ng/25 µl	98 %
		15,6 ng/25 µl	85 %
		7,8 ng/25 µl	90 %
		3,9 ng/25 µl	90 %
		2,0 ng/25 µl	67 %

Studien viste at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutasjonen i reelle, kliniske FFPET-prøver ved et mutasjonsnivå på ≥ 5 % ved bruk av standardinnmating på 125 ng/25 µl. Testens evne til å detektere mutasjonen ved lavere DNA-innmatingsnivåer viser at prøver kan inneholde forringet DNA fra fikseringsprosessen og allikevel detektere mutasjonen. Én svært pigmentert prøve som var inkludert i studien, så ikke ut til å påvirke testens sensitivitet.

Analytisk sensitivitet ved bruk av cellelinjeblandinger

DNA-konsentrater fra to melanomcellelinjer [SK-MEL 28 (BRAF V600E-mutant) og SK-MEL 2 (BRAF villtype)] ble blandet for å danne en prøve med 5 % mutasjon, som ble verifisert med 454-sekvensering. Det ble tillaget tre separate forynningspaneler som inneholdt fra 125 ng/25 µl til 0 ng/25 µl DNA. Tjue (20) replikater av hver panelprøve ble testet ved bruk av 3 kitlot for **cobas** BRAF-testen (60 replikater totalt). Sensitiviteten ble bestemt med den laveste DNA-mengden som gav en BRAF V600E "Mutation Detected"-rate på minst 95 % (skyggelagt rad). Resultatene fra denne studien er vist i Tabell 7.

Tabell 7
Sensitivitet for cobas BRAF-test ved bruk av cellelinjeblandinger

Cellelinjeblanding	Gjennomsnittlig prosentvis mutasjon ved 454-sekvensering	Mengde DNA i panelprøven	"Mutation Detected"-rate (n = 60)
Cellelinjeblanding	5 %	125,0 ng/25 µl	97 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
		15,6 ng/25 µl	95 %
		7,8 ng/25 µl	98 %
		3,9 ng/25 µl	95 %
		2,0 ng/25 µl	82 %
		1,0 ng/25 µl	78 %
		0,5 ng/25 µl	77 %

cobas BRAF-testen gav en 95 % "Mutation Detected"-rate ved 3,9 ng/25 µl, som representerer en 1:32-fortynning av den anbefalte DNA-innmatingen på 125 ng/25 µl. Dette indikerer at testen vil detektere BRAF V600E-mutasjonen når ~97 % av DNA er forringet grunnet fikseringsprosessen, forutsatt at cellelinje-DNA inneholdt 100 % intakt og amplifiserbart DNA.

Genominnmatingsområde

Anbefalt DNA-innmating for **cobas** BRAF-testen er 125 ng. Feil ved DNA-kvantitering og/eller variasjon i mengden forringet DNA kan føre til varierende innmatingsmengder av genomisk DNA. For å evaluere effekten av varierende innmatingsmengder av genomisk DNA, ble genomisk DNA ekstrahert fra 11 melanom-FFPET-prøver, som var utvalgt ut fra mutasjonsstatus og pigmenteringsnivå, og ble serielt fortynnet med prøveinnmating som representerte 250 ng, 125 ng, 62,5 ng og 31,3 ng/25 µl. Alle 4 DNA-nivåer ble evaluert ved bruk av 2 lot. Det ble oppnådd forventede resultater for alle innmatingsmengder av genomisk DNA.

Minimalt tumorinnhold

Trettitre (33) BRAF V600E-mutantprøver ble testet for å bestemme den minste tumorandelen som var påkrevd for å detektere BRAF V600E-mutasjonen i prøver med tumorinnhold fra 5 % til 50 %, uten makrodisseksjon. Ett (1) snitt fra hver prøve ble testet ved bruk av **cobas** BRAF-test.

cobas BRAF-testen detekterte korrekt alle BRAF V600E-mutantprøver som hadde en minsteprosent med mutant-DNA over 5 % og når det minste tumorinnholdet var minst 15 %, som vist i Tabell 8. Prøver med mindre enn 15 % tumorinnhold og et mutasjonsnivå på mindre enn 5 % ble rapportert som Mutation Not Detected. Ytterligere 24 villtypeprøver med tumorinnhold fra 5 til 45 % ble også evaluert ved anbefalt DNA-innmatingkonsentrasjon på 125 ng/25 µl. Det ble funnet riktig resultat for alle villtypeprøver. Makrodisseksjon for prøver med < 50 % tumorinnhold per område er påkrevd.

Tabell 8
Resultater av testing av 33 BRAF V600E-prøver med forskjellig prosentvis tumorinnhold og prosentvis mutasjon

Prøvenummer	Tumorinnhold*	% mutasjon	Testresultat
1	5 % / 5 %	3 %	Mutation Not Detected
2	5 % / 5 %	5 %	Mutation Not Detected
3	5 % / 5 %	1 %	Mutation Not Detected
4	10 % / 10 %	4 %	Mutation Not Detected
5	10 % / 10 %	14 %	Mutation Detected
6	15 % / 10 %	6 %	Mutation Detected
7	15 % / 15 %	23 %	Mutation Detected
8	15 % / 15 %	3 %	Mutation Detected
9	15 % / 15 %	29 %	Mutation Detected
10	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
11	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
12	15 % / 20 %	5 %	Mutation Detected

Prøvenummer	Tumorinnhold*	% mutasjon	Testresultat
13	20 % / 20 %	28 %	Mutation Detected
14	20 % / 20 %	2 %	Mutation Detected
15	25 % / 20 %	13 %	Mutation Detected
16	25 % / 25 %	25 %	Mutation Detected
17	30 % / 25 %	20 %	Mutation Detected
18	30 % / 30 %	10 %	Mutation Detected
19	30 % / 35 %	4 %	Mutation Detected
20	30 % / 35 %	17 %	Mutation Detected
21	35 % / 30 %	8 %	Mutation Detected
22	35 % / 35 %	7 %	Mutation Detected
23	35 % / 35 %	12 %	Mutation Detected
24	35 % / 35 %	22 %	Mutation Detected
25	35 % / 40 %	36 %	Mutation Detected
26	40 % / 35 %	7 %	Mutation Detected
27	40 % / 35 %	12 %	Mutation Detected
28	40 % / 40 %	14 %	Mutation Detected
29	40 % / 40 %	21 %	Mutation Detected
30	40 % / 40 %	28 %	Mutation Detected
31	40 % / 45 %	36 %	Mutation Detected
32	45 % / 45 %	10 %	Mutation Detected
33	50 % / 40 %	8 %	Mutation Detected

** Tumorinnholdet i prøven ble vurdert av en patolog, som undersøkte det første og siste av 12 påfølgende 5-µm-snitt av hver prøve. Tumorinnholdet i både det første og siste snittet vises (for eksempel 95 % / 95 %).*

Kryssreaktivitet

Kryssreaktiviteten for **cobas** BRAF-test ble evaluert ved å teste følgende prøvetyper:

- BRAF ikke-V600E-mutante melanom-FFPET-prøver med ulike mutasjonsnivåer,
- Plasmider av BRAF ikke-V600E-mutasjoner,
- Plasmider av BRAF-homologer,
- Hudrelaterte mikroorganismer.

Kryssreaktiviteten ble også evaluert ved å bestemme hvorvidt forekomst av BRAF homologe plasmider eller hudrelaterte mikroorganismer interfererte med deteksjon av BRAF V600E-mutasjonen.

BRAF ikke-V600E-melanom-FFPET-prøver

14 melanom-FFPET-prøver med BRAF ikke-V600E-mutasjoner (V600D, V600E2, V600R eller V600K) ble testet i triplikate med **cobas** BRAF-testen. For åtte av BRAF ikke-V600E-prøvene viste alle de tre replikatene kryssreaktivitet med **cobas** BRAF-testen. Disse åtte prøvene var BRAF V600D-mutanter (18 % mutasjon), BRAF V600E2-mutanter (68 % mutasjon) eller BRAF V600K-mutanter (mer enn 30 % mutasjon). Ingen kryssreaktivitet ble observert for BRAF V600R-mutantprøven (23 % mutasjon), som vist i Tabell 9.

Tabell 9

Mutation Detected-rater for cobas BRAF-testen som ble observert for BRAF ikke-V600E-mutasjoner i FFPET-prøver

Prøvenummer	BRAF mutasjonsstatus	Prosentvis mutasjon	Tumorinnhold*	Tumorstadium	"Mutation Detected"-rate (n = 3)
1	V600D	18 %	30 % / 30 %	IV	100 %
2	V600E2	16 %	75 % / 75 %	IV	0 %
3		36 %	75 % / 80 %	III	0 %
4		68 %	75 % / 75 %	IV	100 %
5	V600R	23 %	15 % / 15 %	IV	0 %
6	V600K	17 %	25 % / 25 %	III	0 %
7		22 %	35 % / 40 %	IV	0 %
8		23 %	40 % / 40 %	IV	0 %
9		31 %	60 % / 60 %	IV	100 %
10		35 %	75 % / 75 %	IV	100 %
11		39 %	80 % / 80 %	IV	100 %
12		36 %	95 % / 95 %	IIC	100 %
13		62 %	75 % / 75 %	IV	100 %
14		69 %	80 % / 80 %	IV	100 %

* Tumorinnholdet i prøven ble vurdert av en patolog, som undersøkte det første og siste av 12 påfølgende 5- μ m-snitt av hver prøve. Tumorinnholdet i både det første og siste snittet vises (for eksempel 95 % / 95 %).

Et fortynningspanel med elleve prøver med DNA-konsentrasjoner fra 5,0 ng/ μ l ned til 0,0049 ng/ μ l (samsvarer med mellom 125 til 0,1 ng DNA i 25 μ l-innmatingsvolumet for testen) ble tillaget, og hver panelprøve ble testet i triplikate for å bestemme den laveste mengden med DNA som gav en 100 % "Mutation Detected"-rate for de åtte prøvene som ble funnet å kryssreagere i **cobas** BRAF-testen. Det laveste DNA-innmatingsnivået før tap av kryssreaktivitet som ble observert, var fra 0,5 ng/25 μ l for en BRAF V600K-mutantprøve med 69 % mutasjon til 15,6 ng/25 μ l for en BRAF V600D-mutantprøve med 18 % mutasjon (Tabell 10).

Tabell 10

Den laveste DNA-innmatingen for å detektere kryssreaktivitet med cobas BRAF-test

Prøvenummer	BRAF mutasjonsstatus	Prosentvis mutasjon	Laveste DNA-innmating før reduksjon av kryssreaktivitet (n = 3)
1	V600D	18 %	15,6 ng/25 μ l
2	V600E2	68 %	7,8 ng/25 μ l
3	V600K	31 %	3,9 ng/25 μ l
4		35 %	3,9 ng/25 μ l
5		39 %	3,9 ng/25 μ l
6		36 %	2,0 ng/25 μ l
7		62 %	3,9 ng/25 μ l
8		69 %	0,5 ng/25 μ l

BRAF ikke-V600E-plasmider

Plasmidfortynningspaneler med mutasjonsnivåer i området fra 5 % til 75 % i en bakgrunn av villtypeplasmid ble tillaget for følgende ni BRAF ikke-V600E-mutasjoner: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K og V600R. Tre replikater av hver prøve i fortynningspanelene som ble preparert for hvert plasmid, ble testet med **cobas** BRAF-testen. Kryssreaktivitet ble observert i alle de 3 replikatene for BRAF V600D-plasmid med \geq 10 % mutasjon, BRAF V600K-plasmid med \geq 35 % mutasjon og BRAF V600E2-plasmid med \geq 65 % mutasjon. Ingen kryssreaktivitet ble observert med plasmider fra de seks andre BRAF-mutasjonene som ble testet.

Plasmider av BRAF-homologer

Prøver ble preparert for tre BRAF-homologplasmider (BRAF-pseudogen, ARAF og RAF1), BRAF V600E-mutantplasmid og BRAF villtypeplasmid, som skissert i Tabell 11. Fra tre til seks replikater av hver panelprøve ble testet med **cobas** BRAF-test.

Tabell 11
BRAF homologplasmidprøver

Panel		Sammensetning etter volum	
Navn	Prøve	Komponent 1	Komponent 2
BRAF pseudogen	1	95 % BRAF pseudogen	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % BRAF pseudogen	---
ARAF	1	95 % ARAF	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % ARAF	---
RAF1	1	95 % RAF1	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % RAF1	---
Kontroll	1	95 % BRAF villtype	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % BRAF villtype	---
	3	95 % DNA-elueringsbuffer	5 % BRAF V600E-mutant

Ingen av de tre BRAF-homologplasmidene som ble testet, ble detektert av **cobas** BRAF-testen da de ble testet alene, noe som tyder på at BRAF-homologplasmider ikke kryssreagerer med testen.

BRAF V600E-mutantplasmidet som hadde 5 % ved nærvær av 95 % av BRAF-homologplasmidene, gav som forventet resultatet "Mutation Detected" i alle tilfeller, noe som tyder på at homologplasmidene ikke interfererte ved detektering av BRAF V600E-mutasjonen.

Hudrelaterte mikroorganismer

Følgende hudrelaterte mikroorganismer ble funnet ikke å kryssreagere i **cobas** BRAF-testen da de ble tilsatt i en villtype melanom-FFPET-prøve med 1×10^6 CFU (kolonidannende enheter) under vevslyslingstrinnet:

1. *Staphylococcus epidermidis*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Corynebacterium xerosis*
4. *Corynebacterium jeikeium*
5. *Corynebacterium minutissimum*
6. *Corynebacterium ulcerans*

De testede mikroorganismene interfererte heller ikke med deteksjon av en FFPET-prøve med 8 % BRAF V600E-mutasjon da 1×10^6 CFU (kolonidannende enheter) ble tilsatt under vevslyslingstrinnet.

Interferens

Triglycider (≤ 74 mM, $2 \times$ CLSI-anbefalt høy konsentrasjon¹⁷), hemoglobin (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ CLSI-anbefalt høy konsentrasjon¹⁷) og ≤ 95 % nekrotisk vev viste seg ikke å interferere med **cobas** BRAF-test da den potensielt interfererende substansen ble tilsatt i lyslingstrinnet under prøveprepareringsprosedyren.

Melanin

Virkningen av høye konsentrasjoner med endogent melanin ble evaluert ved bruk av svært pigmenterte melanom-FFPET-prøver. Til sammen 41 unike FFPET-prøver med melanomtumorvev ble utvalgt basert på pigmenteringsnivået: 33 var svært pigmenterte, 3 var fra afro-amerikanere, og 5 var lett pigmenterte for sammenligning. DNA ble ekstrahert fra vevet, og melaninkonsentrasjonen ble bestemt for hver prøve. Et enkelt replikat av DNA-konsentratet fra hvert av de to snittene ble tillaget fra hver av de 41 prøvene som ble testet. Tre prøver gav ugyldige resultater. Én prøve gav resultatet "Mutation Not Detected", men denne prøven ble funnet å være under deteksjonsgrensen. De 3 prøvene med resultatet "Invalid" ble brukt til å tillage anbefalt DNA-konsentrasjon for testen samt to-folds, fire-folds og åtte-folds fortyninger av anbefalt DNA-innmating på 125 ng/PCR. De resulterende fortynte DNA-prøvene (som inneholdt til sammen 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng eller 15,6 ng DNA i de 25 μ l), ble testet på nytt for å finne ut om den tilsvarende reduksjonen av melanin ved fortyning gjorde det mulig å finne gyldige resultater. Alle de tre prøvene gav korrekte resultater med to-folds fortyning.

Tabell 12
Sammendrag av ytelsen for cobas BRAF-test med pigmenterte melanom-FFPET-prøver

Prøve-ID	Fortynning	Melaninmengde i prøve/PCR	Resultat
1	Ingen (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	To-folds (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-folds (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Åtte-folds (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Ingen (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	To-folds (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-folds (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Åtte-folds (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Ingen (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	To-folds (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-folds (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Åtte-folds (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Resultatene av testing av de 17 viltypeprøvene viste at alle prøvene fikk et korrekt "Mutation Not Detected"-resultat, med unntak av 2 svært pigmenterte prøver som gav falske positive resultater.

KLINISK YTELSE

Reproduserbarhet

Det ble utført en studie for å vurdere reproduserbarheten til **cobas** BRAF-testen, på 3 eksterne teststeder (2 operatører per sted), ved bruk av 3 reagenslot og over 5 ikke etterfølgende testdager, med et panel med 8 DNA-prøver fra FFPET-snitt av malignt melanom. Dette panelet inkluderte både pigmenterte og ikke-pigmenterte prøver og dekket et område med prosentvist tumorinnhold og prosentvise mutantalleler, inkludert én prøve på deteksjonsgrensen (LoD) på 5 %. Av 94 analyseserier var 92 (97,9 %) gyldige. Av 1442 testede prøver gav 2 prøver (0,14 %) ugyldige resultater. For alle panelprøvene, med unntak av LoD-prøvene, ble det funnet korrekte mutasjonstyper for 100 % av gyldige tester, inkludert panelprøver med 20 % mutasjon, og to panelprøver som ble funnet å være svært pigmenterte. For LoD-panelprøven ble V600E-mutasjonen detektert i 90 % (162/180) av prøvene. Det var ingen falske positive for noen av de testede WT-prøvene. Samlet viste **cobas** BRAF-testen høy reproduserbarhet for både pigmenterte og ikke-pigmenterte prøver, i prøver med lavt tumorinnhold og med lav prosentandel av mutantalleler, og for alle teststeder, operatører, reagenslot og testdager. Den analytiske spesifisiteten var 100 %.

Korrelasjon til referansemetode for prøver fra klinisk studie i Fase III

Forekomsten av V600E-mutasjonen i Fase III av den kliniske studien var 46,5 % basert på resultatene med **cobas** BRAF-testen. Dette samsvarer med forekomsten av V600E hos melanompasienter, som rapportert i litteraturen.

For å evaluere ytelsen til **cobas** BRAF-testen sammenlignet med 2× bidireksjonal Sanger-sekvensering, ble det identifisert 596 etterfølgende pasienter som var screenet for Fase III-studien av vemurafenib, og som det var samlet inn kliniske og demografiske data samt Sanger-sekvenseringsdata for. Av disse kasusene var 94 ikke-kvalifiserte grunnet manglende inklusjonskriterier, 4 kasus manglet patologigranskning, og 2 kasus hadde ugyldige resultater med **cobas** BRAF-testen. Av de resterende, kvalifiserte 496 kasusene hadde 47 prøver ugyldige Sanger-sekvenseringsresultater, noe som resulterte i 449 evaluerbare kasus. Samsvarsanalysen mellom resultater med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering for deteksjon av V600E-mutasjonen vises i Tabell 13 nedenfor.

Tabell 13
Sammendrag av resultater med cobas BRAF-testen sammenlignet med Sanger-sekvensering

cobas BRAF-testen (testmetode)	Sanger-sekvensering (referansemetode)		
	BRAF V600E-mutasjon detektert^a	BRAF V600E-mutasjon ikke detektert^b	Totalt
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Totalt	222	227	449
Positivt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 216 / 222 = 97,3 % (94,2 %, 98,8 %)		
Negativt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 192 / 227 = 84,6 % (79,3 %, 88,7 %)		
Samlet prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 408 / 449 = 90,9 % (87,8 %, 93,2 %)		

^a Resultatet "Mutation Detected" indikerer forekomst av den dominerende BRAF-mutasjonstypen, V600E (1799 T>A), som identifisert med Sanger-sekvensering.

^b Resultatet "Mutation Not Detected" indikerer fravær av den dominerende BRAF-mutasjonstypen, V600E, som identifisert med Sanger-sekvensering (dvs. villtype eller ingen mutasjon, V600D, V600E2, V600K, V600R og andre mutasjoner).

Merk: Melanomprøver med gyldige parede resultater fra både **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering.

Merk: KI = (bedømming) konfidensintervall.

Alle de 41 prøvene som gav avvikende resultater med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering, gjennomgikk 454-sekvensering (kvantitativ, massiv parallell pyrosekvenseringsmetode) som andre referansemetode. I tillegg ble 33 prøver med samsvarende resultater med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering testet med 454-sekvensering. Den sekundære samsvarsanalysen, etter løsning av avvikende resultater, vises i Tabell 14.

Av de 6 avvikende prøvene som hadde resultatet "Mutation Not Detected" med **cobas** BRAF-testen og et V600E-resultat med Sanger-sekvensering, gav 454-sekvensering et villtyperesultat i 5/6 prøver (én prøve hadde et ugyldig resultat med 454-sekvensering).

Av de 8/35 avvikende prøvene som hadde resultatet "Mutation Detected" med **cobas** BRAF-testen og et WT-resultat med Sanger-sekvensering, detekterte 454-sekvensering en V600E-mutasjon i 7/8 prøver (én prøve hadde et ugyldig resultat med 454-sekvensering).

Av de 27/35 avvikende prøvene som hadde resultatet "Mutation Detected" med **cobas** BRAF-testen og et ikke-V600E-resultat med Sanger-sekvensering, detekterte 454-sekvensering en V600K-mutasjon i 24 prøver, en V600E2 i én prøve og en V600E i én prøve. I én prøve detekterte Sanger-sekvensering en V600D-mutasjon, og 454-sekvensering gav et villtyperesultat.

cobas BRAF-testens kryssreaktivitet for V600K var 66 % (25/38).

Samsvaret med 454-sekvensering var 100 % for de 33 prøvene som hadde samsvarende resultater for V600E og villtype med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering.

Tabell 14
Resultater med cobas BRAF-testen sammenlignet med Sanger-sekvensering etter at avvikende resultater ble løst med 454-sekvensering

cobas BRAF-testen (testmetode)	Etter at avvikende resultater ble løst med 454-sekvensering		
	BRAF V600E-mutasjon detektert	BRAF V600E-mutasjon ikke detektert	Totalt
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Totalt	225	224	449
Positivt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 224 / 225 = 99,6 % (97,5 %, 99,9 %)		
Negativt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 197 / 224 = 87,9 % (83,0 %, 91,6 %)		
Samlet prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 421 / 449 = 93,8 % (91,1 %, 95,7 %)		

Distribusjon av mutasjoner i BRAF-kodon 600

Distribusjonen av mutasjoner i kodon 600 ble bestemt i de 496 kvalifiserte kasusene basert på et kompositt av resultater med Sanger- og 454-sekvensering. Av disse 496 kasusene var 182 kasuser villtyper og 314 kasuser var mutante. Distribusjonen av mutasjoner i kodon 600 i 314 mutasjonsp positive kasus er beskrevet i Tabell 15. V600K-mutasjoner ble identifisert i 13,4 % av alle kasus med mutasjoner i kodon 600.

Tabell 15
Distribusjonen av mutasjoner i BRAF-kodon 600 for den mutasjonsp positive populasjonen som bestemt med Sanger-sekvensering og/eller 454-sekvensering

Aminosyresekvens (kodon 600)	Nukleotidsekvens (1798–1800)	N	% distribusjon
V600E	GAG	255	81,2
V600K	AAG	42	13,4
V600E2	GAA	13	4,1
V600R	AGG	3	1,0
V600D	GAC	1	0,3
Sum av mutanter i kodon 600		314	100
Sum av villtype i kodon 600		182	---

Klinisk effekt av ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

cobas BRAF-testen ble brukt som “companion”-test for å velge pasienter for behandling med ZELBORAF®. Den kliniske sikkerheten for og effekten av ZELBORAF® ble vist i NO25026-studien (BRIM3), en internasjonal, randomisert, åpen, kontrollert, multisenter fase III-studie av tidligere ubehandlede pasienter med ikke-resecerbar melanom i stadium IIIC eller stadium IV med en V600E BRAF-mutasjon, for å vurdere den kliniske effekten av ZELBORAF® sammenlignet med dacarbazin (standardbehandling). FFPET-prøver fra alle melanom pasienter som ble vurdert for behandling, ble testet med **cobas** BRAF-testen. Pasienter med testresultatet “Mutation Detected” ble kvalifisert for innmelding i legemiddelstudien hvis de oppfylte andre inklusjonskriterier. Pasienter med testresultatet “Mutation Not Detected” ble ikke kvalifisert for innmelding i legemiddelstudien. Studien ble utført på ca. 104 sentre verden over (22 sentre i USA).

675 pasienter var innmeldt i studien. 337 ble anvist til å få vemurafenib, og 338 til å få dacarbazin. De primære effektmålene for studien var samlet overlevelse (OS) og utprøvervurdert progresjonsfri overlevelse (PFS). Andre effektmål inkluderte bekreftet utprøvervurdert beste samlede responsrate.

Baselinekarakteristika var balansert mellom behandlingsgruppene. De fleste pasientene var menn (56 %) og kaukasiske (99 %). Medianalderen var 54 år (24 % var ≥ 65 år). Alle pasientene hadde ECOG-ytelsesstatus 0 eller 1, og de fleste av pasientene hadde metastatisk sykdom (95 %).

Effektresultatene fra studien vises nedenfor i Tabell 16 og Figur 2:

Tabell 16
Effekt av vemurafenib hos behandlingsnaive pasienter med BRAFV600E-mutasjonsp positiv-melanom^a

	Vemurafenib (N=337)	Dacarbazin (N=338)	p-verdi ^d
Samlet overlevelse			
Antall dødsfall	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Median overlevelse (måneder) (95 % KI) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Median oppfølging (måneder) (område)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Hazard ratio for progresjonsfri overlevelse (95 % KI) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Median PFS (måneder) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a Som detektert av **cobas** BRAF-testen

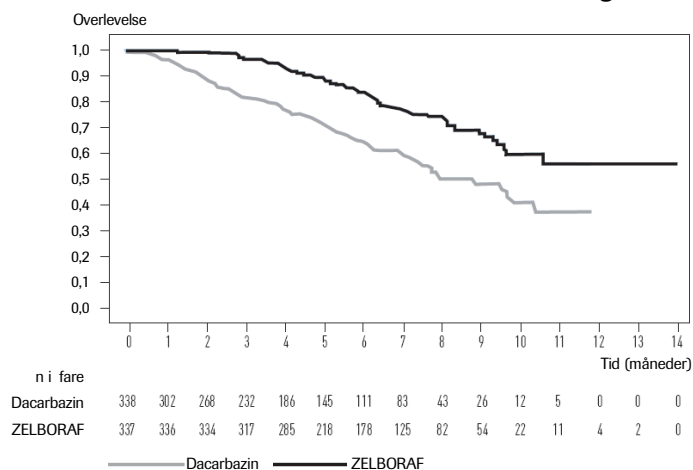
^b Hazard ratio anslått ved bruk av Cox-modellen; en hazard ratio på < 1 taler til fordel for vemurafenib

^c Kaplan-Meier-estimat

^d Ustratifisert log-rank-test

^e Ikke oppnådd

Figur 2
Kaplan-Meier-kurver for samlet overlevelse – behandlingsnaive pasienter



Den bekreftede, utprøvervurderte beste samlede responsraten var 48,4 % (95 % KI: 41,6 %, 55,2 %) i ZELBORAF®-gruppen sammenlignet med 5,5 % (95 % KI: 2,8 %, 9,3 %) i dacarbazin-gruppen.

Klinisk effekt av COTELLIC® (cobimetinib)^{10, 11}

COTELLIC®, en MEK-hemmer, ble testet i en klinisk studie (coBRIM) i kombinasjon med ZELBORAF® sammenlignet med ZELBORAF® pluss placebo. **cobas** BRAF-testen ble brukt for å bestemme om pasienter var kvalifisert for innmelding i denne kliniske studien. Sikkerheten og effekten av kombinasjonen av COTELLIC® og ZELBORAF® ble fastslått i en multisenter, randomisert (1:1), dobbeltblindet, placebokontrollert studie, som ble utført på 495 pasienter med tidligere ubehandlet BRAF V600-mutasjonspositiv, ikke-resecerbar eller metastatisk melanom. Det primære effektmålet var utprøvervurdert progresjonsfri overlevelse (PFS) per RECIST v1.1. Andre effektmål var utprøvervurdert bekreftet objektiv responsrate (ORR), samlet overlevelse (OS), PFS som vurdert med blindet uavhengig sentral granskning, og responsvarighet (DOR).

Baselinekarakteristika var balansert mellom behandlingsgruppene. De fleste pasientene var menn (58 %) og kaukasiske (93 %). Medianalderen var 55 år. 72 % av pasientene hadde ECOG-ytelsesstatus på 0, og 60 % av pasientene hadde sykdom i stadium M1c.

FFPET-prøver fra alle pasienter som ble vurdert for behandling, ble testet med **cobas** BRAF-testen. Pasienter med resultatet "Mutation Detected" ble kvalifisert for innmelding i studien hvis de oppfylte andre inklusjonskriterier. Pasienter med resultatet "No Mutation Detected" ble ikke kvalifisert for innmelding i studien. Studien inkluderte pasienter med BRAF V600K-mutasjoner som var detektert med **cobas** BRAF-testen, og viste legemiddelsikkerhet og -effekt for andelen av pasientpopulasjonen med detekterte tumorer som inneholdt V600K.

Effektresultatene fra studien vises nedenfor i Tabell 17 og Figur 3:

Tabell 17

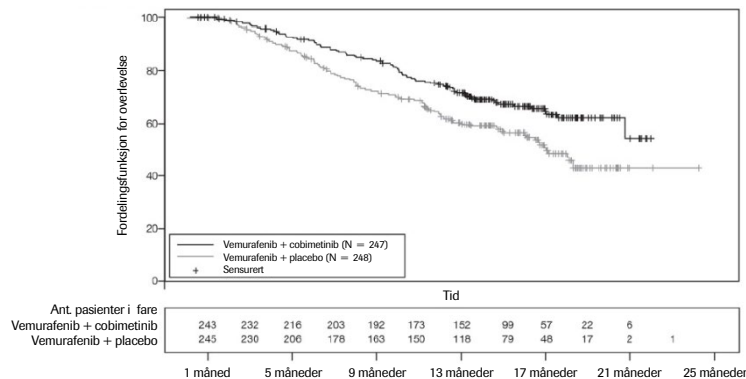
Effekt av cobimetinib i kombinasjon med vemurafenib hos pasienter med BRAF-mutasjonspositiv-melanom^a

	Cobimetinib + vemurafenib (N = 247)	Placebo + vemurafenib (N = 248)	p-verdi
Progresjonsfri overlevelse (utprøvervurdert)			
Antall hendelser (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progresjon	131	169	
Dødsfall	12	11	
Median PFS (måneder) (95 % KI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Samlet overlevelse			
Antall dødsfall (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Median overlevelse (måneder) (95 % KI) ^c	Kan ikke anslås (20,7, Kan ikke anslås)	17,0 (15,0, Kan ikke anslås)	-
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektiv responsrate			
Objektiv responsrate (95 % KI) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Komplett respons	16 %	10 %	
Delvis respons	54 %	40 %	
Median responsvarighet, måneder (95 % CI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

- ^a Som detektert av **cobas** BRAF-testen
- ^b Hazard ratio anslått ved bruk av Cox-modellen; en hazard ratio på < 1 taler til fordel for cobimetinib + vemurafenib
- ^c Kaplan-Meier-estimat
- ^d Stratifisert log-rank-test
- ^e Statistisk signifikans avhengig av sammenligning av tilordnet alfa på 0,019 for denne interimanalysen

Figur 3

Kaplan-Meier-kurver for samlet overlevelse



Tilgjengelige tumorprøver fra randomiserte pasienter ble analysert retrospektivt ved bruk av neste generasjon sekvensering (NGS) for videre klassifisering av BRAF-mutasjonene som V600E eller V600K. Testresultater ble oppnådd for 81 % av de randomiserte pasientene (400/495). Blant de pasientene som NGS var vellykket for, hadde 56 av 400 (14 %) tumorer med BRAF V600K-mutasjoner, og de resterende pasientene hadde tumorer med BRAF V600E-mutasjoner. De 56 tumorene som retrospektivt ble funnet å ha BRAF V600K-mutasjonen, hadde mutasjonsfrekvenser mellom 5,1 og 36,6 % i denne analysen. Det ble observert en trend til fordel for kombinasjonen av cobimetinib og vemurafenib i eksploratoriske subgruppeanalyser av progresjonsfri overlevelse (PFS), samlet

overlevelse (OS) og bekreftet objektiv responsrate (ORR) for BRAF V600-mutasjonssubtypene hos de 81 % av pasientene i denne studien der BRAF V600-mutasjonstypen ble fastslått.

II. PAPILLÆRT THYROIDEAKARSINOM (PTC)

EVALUERING AV ANALYTISK YTELSE

For de analytiske studiene som beskrives nedenfor, ble tumoregenskaper som prosentvis tumorinnhold vurdert med patologigranskning. Bidireksjonal Sanger-sekvensering ble brukt for å velge ut prøver for testing. Prosentvis mutasjonsnivå ble bestemt ved bruk av 454-sekvensering (kvantitativ, massiv parallell pyrosekvenseringsmetode).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet – Deteksjonsgrense (LoD)

Den minste mengden med innmatet DNA som gir korrekte resultater 95 % av tiden, ble vurdert ved bruk av fortynningspaneler som ble fremstilt av to typer prøver:

- Prøveblandinger som var fremstilt ved å blande DNA-konsentrater fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver og BRAF villtype FFPET-prøver, for å oppnå spesifikke mutasjonsnivåer.
- Individuelle FFPET DNA-konsentrater fremstilt fra to BRAF V600E-mutante FFPET-prøver.

Alle prøver brukt i denne studien ble sekvensert med 454-sekvensering for å fastslå den prosentvise mutasjonen i hver prøve.

Analytisk sensitivitet ved bruk av prøveblandinger

DNA-konsentrater fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver ble blandet med DNA-konsentrater fra BRAF villtype FFPET-prøver for å danne én prøve med mutasjonsnivå ~10 %, én prøve med mutasjonsnivå ~5 %, én prøve med mutasjonsnivå ~2 %. Etter blanding ble mutasjonsnivåene verifisert med 454-sekvensering. Hver av de tre prøveblandingene med V600E-mutasjon ble deretter fortynnet for å danne panelprøvene som er beskrevet i Tabell 18.

Tabell 18
Tillaging av fortynningspanelprøver fra prøveblandinger

Blanding	Gjennomsnittlig % mutasjon*	Mengde DNA i fortynningspanelprøver (ng/25 µl)**
10 % blanding	10 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5 % blanding	5 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5 % blanding	2 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0 % (kun villtype)	- - -	125

* Gjennomsnittlig prosentvis mutasjon av blandingen, testet med 454-sekvensering.

** Mengde genomisk DNA i hver panelprøve. 25 µl er prøveinnmatingsvolumet for testen.

Åtte (8) replikater av hver panelprøve ble analysert ved bruk av 3 kitlot for **cobas** BRAF-testen (n = 24/panelprøve). Tabell 19 viser sensitiviteten for hver FFPET-blanding, som ble bestemt med den laveste DNA-mengden som gav en BRAF V600E "Mutation Detected"-rate på minst 95 % (skyggelagte rader).

Tabell 19
Sensitivitet for cobas BRAF-testen ved bruk av FFPET-blandinger

FFPET-blanding	Prosentvis mutasjon ved 454-sekvensering	Mengde DNA i panelprøven	"Mutation Detected"-rate (n = 24)
10 % FFPET-blanding	10 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	100 %
		0,5 ng/25 µl	92 %
		0,2 ng/25 µl	83 %
		0,1 ng/25 µl	29 %
5 % FFPET-blanding	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	83 %
		0,5 ng/25 µl	54 %
		0,2 ng/25 µl	67 %
		0,1 ng/25 µl	25 %
2,5 % FFPET-blanding	2 %	125 ng/25 µl	0 %
		41,7 ng/25 µl	0 %
		13,9 ng/25 µl	4 %
		4,6 ng/25 µl	21 %
		1,5 ng/25 µl	21 %
		0,5 ng/25 µl	33 %
		0,2 ng/25 µl	13 %
		0,1 ng/25 µl	8 %
0 % (villtype)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Denne studien viser at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutasjonen ved et mutasjonsnivå på ≥ 5 % ved bruk av standardinnmating på 125 ng/25 µl. Testens evne til å detektere mutasjonen ved lavere DNA-innmatingsnivåer viser at prøver kan inneholde forringet DNA fra fikseringsprosessen og allikevel detektere mutasjonen. Alle testresultater som ble oppnådd for BRAF villtypeprøven, var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet ved bruk av FFPET-prøver

For å bekrefte den hevdede 5 % mutasjonsdeteksjonen i pasientprøver ble 24 individuelle 5-µm-snitt fra to BRAF V600E-mutante FFPET-prøver som inneholdt mutasjonsnivåer på 6 % og 11 %, behandlet individuelt ved bruk av 3 lot med **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit for å isolere DNA. Seriefortynninger av DNA fra hvert snitt ble preparert for å danne et sett med 8 panelprøver, som beskrevet i Tabell 20.

Tabell 20
Tillaging av fortynningspanelprøver fra FFPET-prøver

	Gjennomsnittlig % V600E-mutasjon*	Mengde DNA i fortynningspanelprøver (ng/25 µl)
Prøve 1	6 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Prøve 2	11 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* Gjennomsnittlig prosentvis mutasjon for prøven, bestemt med 454-sekvensering.

Åtte (8) replikater av hver panelprøve ble analysert ved bruk av 3 kitlot for **cobas** BRAF-testen (n = 24/panelprøve). Sensitiviteten for hver FFPET-blanding ble bestemt med den laveste DNA-mengden som gav en BRAF V600E "Mutation Detected"-rate på minst 95 % (skyggelagte rader). Resultatene fra denne studien er vist i Tabell 21.

Tabell 21
Sensitivitet for cobas BRAF-test ved bruk av FFPET-prøver

FFPET-prøve	Prosentvis mutasjon ved 454-sekvensering	Mengde DNA i panelprøven	"Mutation Detected"-rate (n = 48)
Prøve 1	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	83 %
		1,5 ng/25 µl	71 %
		0,5 ng/25 µl	29 %
		0,2 ng/25 µl	17 %
		0,1 ng/25 µl	0 %
Prøve 2	11 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	71 %
		1,5 ng/25 µl	46 %
		0,5 ng/25 µl	17 %
		0,2 ng/25 µl	13 %
		0,1 ng/25 µl	8 %

Studien viste at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutasjonen i reelle, kliniske FFPET-prøver ved et mutasjonsnivå på ≥ 5 % ved bruk av standardinnmating på 125 ng/25 µl. Testens evne til å detektere mutasjonen ved lavere DNA-innmatingsnivåer viser at prøver kan inneholde forringet DNA fra fikseringsprosessen og allikevel detektere mutasjonen.

Repeterbarhet

Det ble utført en studie for å vurdere repeterbarheten for **cobas** BRAF-testen, ved bruk av 2 reagenslot, 2 operatører over 4 testdager, med 5 papillære thyroideacancer FFPET-prøver. Disse FFPET-prøvene inkluderte et område for prosentvis tumorinnhold (50 til 70 %) og prosentvise mutantalleler (16 til 22 %), inkludert to V600E-mutantprøver med ~16 til 18 % mutasjon (~3 × LoD). Det ble funnet korrekte mutasjonstyper for 100 % av de testede prøvene (80/80). Det var ingen falske positive for noen av de testede WT-prøvene. Samlet viste **cobas** BRAF-testen høy repeterbarhet for prøver med lavt tumorinnhold og med lav prosentandel av mutantalleler, og for alle operatører, reagenslot og testdager.

Korrelasjon til referansemetode

For å evaluere ytelsen til **cobas** BRAF-testen sammenlignet med 2× bidireksjonal Sanger-sekvensering, ble det samlet inn Sanger-sekvenseringsdata for 159 PTC FFPET-prøver. Den primære samsvarsanalysen mellom resultater med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering for deteksjon av V600E-mutasjonen vises i Tabell 22 for en av de to testede reagenslotene. Den andre loten gav lignende resultater, med unntak av én prøve som gav resultatet "Mutation Not Detected". Oppløsning med 454-sekvensering fastslo at prøven inneholdt 1,4 % mutasjon og var under den hevdede sensitiviteten på 5 % for **cobas** BRAF-testen.

Tabell 22
Sammendrag av resultater med cobas BRAF-testen sammenlignet med Sanger-sekvensering

cobas BRAF-testen (testmetode)	Sanger-sekvensering (referansemetode)		
	BRAF V600E-mutasjon detektert^a	BRAF V600E-mutasjon ikke detektert^b	Totalt
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Totalt	89	70	159
Positivt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 88 / 89 = 98,9 % (93,9 %, 99,8 %)		
Negativt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 57 / 70 = 81,4 % (70,8 %, 88,8 %)		
Samlet prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 145 / 159 = 91,2 % (85,8 %, 94,7 %)		

^a Resultatet "Mutation Detected" indikerer forekomst av den dominerende BRAF-mutasjonstypen, V600E (1799 T>A), som identifisert med Sanger-sekvensering.

^b Resultatet "Mutation Not Detected" indikerer fravær av den dominerende BRAF-mutasjonstypen, V600E, som identifisert med Sanger-sekvensering (dvs. villtype eller ingen mutasjon og andre mutasjoner).

Merk: KI = (bedømming) konfidensintervall.

Alle prøvene som gav avvikende resultater med **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekvensering, gjennomgikk 454-sekvensering (kvantitativ, massiv parallell pyrosekvenseringsmetode) som andre referansemetode. Den sekundære samsvarsanalysen, etter løsning av avvikende resultater, vises i Tabell 23.

Én avvikende prøve hadde resultatet "Mutation Not Detected" med **cobas** BRAF-testen og et V600E-resultat med Sanger-sekvensering. 454-sekvensering gav et villtyperesultat som samsvarte med **cobas** BRAF-testen.

For 12 av de 13 avvikende prøvene som hadde resultatet "Mutation Detected" med **cobas** BRAF-testen og villtype med Sanger-sekvensering, viste 454-sekvensering en V600E-mutasjon (1,2–19 % allelfrekvens) som samsvarte med **cobas** BRAF-testen.

Den gjenværende avvikende prøven som viste resultatet "Mutation Detected" for V600E med **cobas** BRAF-testen, var villtype med Sanger-sekvensering, og var også villtype med 454-sekvensering. Ytterligere utforskning med 454-sekvensering bekreftet at prøven hadde en lav prosentandel med V600E-mutant.

Tabell 23
Resultater med cobas BRAF-testen sammenlignet med Sanger-sekvensering
etter at avvikende resultater ble løst med 454-sekvensering

cobas BRAF-testen (testmetode)	Sanger-sekvensering etter at avvikende resultater ble løst med 454-sekvensering		
	BRAF V600E-mutasjon detektert	BRAF V600E-mutasjon ikke detektert	Totalt
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Totalt	101	58	159
Positivt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 101 / 101 = 100,0 % (96,3 %, 100,0 %)		
Negativt prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 57 / 58 = 98,3 % (90,9 %, 99,7 %)		
Samlet prosentvis samsvar (95 % KI)	100 % × 158 / 159 = 99,4 % (96,5 %, 99,9 %)		

LISTE OVER RESULTATFLAGG

Du finner resultatflagg på fanen Results. Kilden for et flagg indikeres i feilkoden, som beskrevet i den følgende Tabell 24. Tabell 25 viser alle flagg tilknyttet tolkning av resultater som er relevante for brukeren.

Tabell 24
Årsak til flagget

Flaggkode starter med	Årsak til flagget	Eksempel
M*	Flere årsaker eller andre årsaker	M6
R	Tolkning av resultater	R200
Z*	Analysator	Z1

* Se operatørmanualen for **cobas**[®] 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**[®] 4800-systemet

Tabell 25
Liste over flagg tilknyttet tolkning av resultater

Flaggkode	Alvorlighetsgrad	Beskrivelse	Anbefalt tiltak
R200	Feil	Mutant control invalid.	Gjenta oppsettet. Se pakningsvedlegget for testen. Denne flaggkoden angir at enten: <ol style="list-style-type: none">1. En observert terskelverdi for mutantkontrollen var under den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for lav). Dette kan forekomme ved DNA-kontaminering eller en algoritmefeil på grunn av atypisk fluorescensmønster, eller2. En observert terskelverdi for mutantkontrollen var over den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for høy). Dette kan forekomme ved 1) uriktig preparering av Working Master Mix, 2) pipetteringsfeil ved tilsetning av Working Master Mix i en reaksjonsbrønn på mikrobrønnplaten, eller 3) pipetteringsfeil ved tilsetning av mutantkontroll i en reaksjonsbrønn på mikrobrønnplaten.
R201	Feil	Wild-type control invalid.	Gjenta oppsettet. Se pakningsvedlegget for testen. Denne flaggkoden angir at enten: <ol style="list-style-type: none">1. En observert terskelverdi for villtypekontrollen var under den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for lav). Dette kan forekomme ved DNA-kontaminering eller en algoritmefeil på grunn av atypisk fluorescensmønster, eller2. En observert terskelverdi for villtypekontrollen var over den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for høy). Dette kan forekomme ved 1) uriktig preparering av Working Master Mix, 2) pipetteringsfeil ved tilsetning av Working Master Mix i en reaksjonsbrønn på mikrobrønnplaten, eller 3) pipetteringsfeil ved tilsetning av villtypekontroll i en reaksjonsbrønn på mikrobrønnplaten.
R202	Feil	Mutant Ct not detected.	Gjenta prøven. Se pakningsvedlegget for testen. Denne flaggkoden angir at en mutantterskelverdi ikke ble observert for prøven. Dette kan indikere fravær av mutasjonen i prøven eller kan indikere ett eller flere av følgende: <ol style="list-style-type: none">1. Lav prosentandel mutantsekvenser som er under testens deteksjonsgrense.2. Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven.3. Utilstrekkelig prøveprosessering.4. Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven.5. Sjeldne mutasjoner innen regionene av det genomiske DNA-et dekket av primerne og/eller mutantprøben.6. Prøvepipetteringsfeil eller prøve-DNA kan ikke tilsettes i reaksjonsbrønnen.

Flaggkode	Alvorlighetsgrad	Beskrivelse	Anbefalt tiltak
R203	Feil	Wild-type Ct not detected.	<p>Gjenta prøven. Se pakningsvedlegget for testen.</p> <p>Denne flaggkoden angir at en villtypeterskelverdi ikke ble observert for prøven. Fraværet av en villtypeterskelverdi antyder ett eller flere av følgende:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven. 2. Utilstrekkelig prøveprosessering. 3. Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven. 4. Sjeldne mutasjoner innen regionene av det genomiske DNA-et dekket av primerne og/eller villtypeproben. 5. Prøve-DNA er kanskje ikke tilsatt i en eller flere brønner.
R204	Feil	Mutant Ct out of range.	<p>Gjenta prøven. Se pakningsvedlegget for testen.</p> <p>Denne flaggkoden angir at enten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. En observert mutantterskelverdi for prøven var under den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for lav). Dette kan forekomme hvis PCR-blandingen er vesentlig overlastet med konsentrert genomisk DNA eller på grunn av en algoritmefeil på grunn av atypisk fluorescensmønster, eller 2. En observert mutant terskelverdi for prøven var over den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for høy). Dette kan indikere ett eller flere av følgende: <ul style="list-style-type: none"> • Lav prosentandel mutantsekvenser som er under testens deteksjonsgrense. • Pipetteringsfeil ved tilsetning av prøve-DNA i reaksjonsbrønnen. • Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven. • Utilstrekkelig prøveprosessering. • Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven. • Sjeldne mutasjoner innen regionene av det genomiske DNA-et dekket av primerne og/eller mutantproben.
R205	Feil	Wild-type Ct out of range.	<p>Gjenta prøven. Se pakningsvedlegget for testen.</p> <p>Denne flaggkoden angir at enten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. En observert villtypeterskelverdi for prøven var under den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for lav). Dette kan forekomme hvis PCR-blandingen er vesentlig overlastet med konsentrert genomisk DNA eller på grunn av en algoritmefeil på grunn av atypisk fluorescensmønster, eller 2. En observert villtypeterskelverdi for prøven var over den fastsatte terskelen (dvs. terskelverdi for høy). Dette kan indikere ett eller flere av følgende: <ul style="list-style-type: none"> • Pipetteringsfeil ved tilsetning av prøve-DNA i reaksjonsbrønnen. • Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven. • Utilstrekkelig prøveprosessering. • Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven. • Sjeldne mutasjoner innen regionene av det genomiske DNA-et dekket av primerne og/eller villtypeproben.

REFERANSER

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949-54.
2. Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24:345-51.
3. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; 353:2135-47
4. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63:1454-7.
5. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003; 22:4578-80.
6. Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genet*. 2003; 33:19-20.
7. COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>), Release v.57 (July 2012)
8. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010; 363:809-19.
9. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-16.
10. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (**coBRIM**): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:1248-60.
11. COTELLIC (cobimetinib) U.S. package insert, Version 2.1, 2016.
12. Siroy AE, Boland GM, Milton DR, et al. Beyond BRAF(V600): clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135:508-15.
13. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Chosewood LC and Wilson DE Biosafety and microbiological and biomedical laboratories. HHS Publication Fifth edition. (CDC) 21-1112. 2009.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA;CLSI, 2014.
16. International Air Transport Association. Dangerous goods regulations, 60th Edition. 2019.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry. Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP7-A2 Appendix D: Wayne, PA;CLSI, 2005

Informasjon om dokumentrevisjon	
Doc Rev. 10.0 08/2019	<p>Avsnittene TILTENKT BRUK og SAMMENDRAG OG BESKRIVELSE AV TESTEN er oppdatert.</p> <p>Lagt til avsnittene Klinisk effekt av ZELBORAF® (vemurafenib) og Klinisk effekt av COTELLIC® (cobimetinib).</p> <p>Lagt til informasjon om objektglass-stabilitet i avsnittet PRØVETAKING, -TRANSPORT OG -OPPBEVARING.</p> <p>Lagt til informasjon om melanin i avsnittet TESTENS BEGRENSNINGER.</p> <p>Lagt til generelle språkoppdateringer for å tydeliggjøre og harmonisere med bruksanvisningen til cobas® 4800 BRAF V600 mutasjonstest US-IVD.</p> <p>Kontakt din lokale Roche-representant hvis du har noen spørsmål.</p>
11/2019	<p>Rettet teksten “FFFPET” til “FFPET” og “større enn eller lik”-symbolets skrifttype på side 24 for riktig PDF-gjengivelse.</p> <p>Oppdaterte den harmoniserte symbolsiden.</p> <p>Kontakt din lokale Roche-representant hvis du har noen spørsmål.</p>
Doc Rev. 11.0 06/2020	<p>Fjernet følgende informasjon om DNA Sample Preparation Kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reagenslister og informasjon om sammensetning • Relaterte prosedyretrinn og merknader <p>La til referanse til bruksanvisningen til cobas® DNA Sample Preparation Kit i begynnelse og i avsnittet Begrensninger i prosedyren.</p> <p>Oppdaterte system- og brukerhåndbøker gjennom hele bruksanvisningen til “cobas® 4800-systemets brukerhåndbok eller cobas® 4800-systemets brukerhjelp”.</p> <p>Rettet trykkfeil og oppdaterte for konsekvens og standardisering av språk gjennom hele bruksanvisningen og for konsekvens med den amerikanske bruksanvisningen.</p> <p>La til resultatflagg.</p> <p>Oppdatert referanse for Det internasjonale forbundet for flytransport.</p> <p>Oppdaterte den harmoniserte symbolsiden, avsnittet om varemerker og patenter og distributøradresser.</p> <p>Lagt til fotnote som forklarer at produktsikkerhetsmerkingen primært følger EUs GHS-retningslinjer.</p> <p>Kontakt din lokale Roche-representant hvis du har noen spørsmål.</p>

Produsert i USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Varemerker og patenter

COBAS, COBAS Z og AMPERASE er varemerker for Roche.

Alle andre produktnavn og varemerker tilhører de respektive eierne.

Teknologien for forebygging av smitte i AmpErase-enzymet dekkes av U.S. patent nr. 7,687,247 og eies av Life Technologies og er lisensiert til Roche Molecular Systems, Inc.

Se <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.























06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-11



Følgende symboler brukes ved merking for Roche PCR-diagnostiske produkter.

	Tilleggsprogramvare		Lotnummer
	Autorisert representant i EF		Biologisk risiko
	Strekкодedataark		Katalognummer
	Vennligst se brukerhjelpen		Kun for evaluering av IVD-ytelse
	Inneholder tilstrekkelig til <n> tester		Nedre grense for akseptområdet
	Innhold i kitet		Produsent
	Distribuert av		Oppbevares på et mørkt sted
	<i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr		Temperaturbegrensning
	Testdefinisjonsfil		Utløpsdato
	Øvre grense for akseptområdet	Rx Only	Kun USA: Føderal lov begrenser salg eller bestilling av dette utstyret til leger.
	Globalt handelsnummer		Produksjonsdato
	CE-merket for overholdelse. Denne enheten overholder gjeldende krav for CE-merking av <i>in vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr.		

Teknisk support for kunder i USA 1-800-526-1247