

Se **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) for at få oplysninger om prøveforberedelse.

TILSIGTET BRUG

Den primære brug af **cobas[®]** 4800 BRAF V600-mutationstesten er til detektion af BRAF V600-mutationer i DNA, der er oprenset fra formalinfikseret paraffinindstøbt humant melanomvæv og papillært thyreoideakarcinomvæv (PTC). I melanomer er det beregnet til brug som hjælp til valg af patienter, hvis tumorer indeholder BRAF V600-mutationer, til behandling med ZELBORAF[®] (vemurafenib) alene eller med COTELLIC[®] (cobimetinib) i kombination med ZELBORAF[®] (vemurafenib).

OVERSIGT OVER OG FORKLARING AF TESTEN

Aktiverende mutationer af protoonkogen BRAF forekommer i mange humane cancerformer, inklusive malignt melanom, kolorektal cancer, ovariecancer og thyreoideacancer.^{1, 2} BRAF-mutationer er blevet identificeret i 40-60 % af maligne melanomer,³ og i 36-46 % af papillære thyreoideakarcinomer.^{4, 5} BRAF-mutationer er også almindelige i benigne nævi,⁶ hvilket antyder, at sådanne mutationer forekommer tidligt. Opdagelsen af sådanne somatiske mutationer i BRAF-genet i melanomer, papillære thyreoideakarcinomer og andre humane tumorer har været med til at klarlægge BRAF-kinasens centrale rolle i signalveje, der kontrollerer cellulær proliferation, differentiering og celledød. I normale celler er BRAF en del af en højt reguleret signalvej, der overfører effekten af vækstfaktor-receptorer (som f.eks. EGFR) gennem RAS, RAF, MEK og ERK. Onkogene mutationer i BRAF resulterer i en forøgelse af kinase-funktionen, og gør dermed RAF-MEK-ERK-signalvejen konstitutivt aktiv ved manglen på de typiske vækstfaktorer.

Størstedelen af BRAF-mutationer i melanom, papillære thyreoideakarcinomer og andre humane tumorer forekommer i codon 600.⁷ Den altdominerende mutation ved codon 600 er V600E-mutationen (GTG > GAG). En række dinukleotide mutationer, der påvirker codon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) og V600D (GTG > GAT)] er også blevet observeret, dog ikke så ofte, primært i melanom og sjældent i andre tumorer, såsom kolorektal cancer.

cobas[®] 4800 BRAF V600-mutationstesten er en real-time PCR-analyse, der er designet til at detektere tilstedeværelsen af V600E-mutationen (T1799A). **cobas[®]** 4800 BRAF V600-mutationstesten bruges som en "companion"-diagnostisk test for vemurafenib, som er et lægemiddel, der hæmmer V600E-mutantversionen af BRAF. Kliniske forsøg med vemurafenib til patienter med fremskredne melanomer har vist, at patienter med en V600E-mutant tumor sandsynligvis vil få en klinisk fordel af lægemidlet.^{8, 9} Efterfølgende har et klinisk forsøg med cobimetinib, i kombination med vemurafenib, til patienter med fremskredne melanomer vist, at patienter med enten en V600E- eller V600K-mutant tumor, der er detekteret med **cobas[®]** 4800 BRAF V600-mutationstesten, sandsynligvis vil få en klinisk fordel af denne behandling.^{10, 11} V600K er til stede i ca. 10-15 % af melanomprøver med BRAF V600-mutationer.¹²

PRINCIPPER FOR PROCEDUREN

cobas[®] 4800 BRAF V600-mutationstesten (**cobas** BRAF-test) er baseret på to processer: (1) Manuel prøveforberedelse for at opnå genomisk DNA fra formalinfikseret paraffinindstøbt væv (FFPET), og (2) PCR-amplifikation og detektion af target-DNA ved hjælp af komplementære primerpar og to oligonukleotidprober, der er mærket med forskellige fluorescensfarver. En probe er designet til at detektere vildtype-BRAF V600-sekvensen, og den anden er designet til at detektere V600E-mutationssekvensen. To eksterne kørsels-kontroller medfølger, og vildtype-allelen tjener som intern, fuld proceskontrol.

Klargøring af prøver

FFPET-prøver behandles, og genomisk DNA isoleres, ved hjælp af **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit, en manuel prøveforberedelse baseret på nukleinsyrebinding til glasfibre. Et afparaffineret snit på 5 µm af en FFPET-prøve lyseres ved hjælp af inkubation ved en forhøjet temperatur med en protease og kaotropisk lyserings-/bindingsbuffer, der frigiver nukleinsyrer og beskytter det frigivne genomiske DNA mod DNaser. Efterfølgende tilsættes isopropanol til lysisblandingen, som derefter centrifugeres igennem en kolonne med en glasfiberfilterindsats. Under centrifugeringen bindes det genomiske DNA til glasfiberfilterets overflade. Ubundne stoffer, f.eks. salte, proteiner og andre cellulære urenheder, fjernes ved centrifugering. De bundne nukleinsyrer vaskes og elueres derefter med en vandig opløsning. Mængden af genomisk DNA bestemmes spektrofotometrisk og justeres til en fastsat koncentration, der skal tilsættes amplifikations- og detektionsblandingen. Target-DNA'et amplificeres derefter og detekteres på **cobas z** 480-analyse-instrumentet ved hjælp af de amplifikations- og detektionsreagenser, der følger med **cobas** BRAF-testkittet.

PCR-amplifikation og -detektion

Valg af target

cobas BRAF-testen anvender primere, der definerer en 116-baseparasekvens af human genomisk DNA indeholdende BRAF codon 600-stedet i exon 15. Hele BRAF-genet amplificeres ikke. **cobas** BRAF-testen er designet til at detektere den nukleotide 1799 T > A-ændring i BRAF-genet, hvilket resulterer i en valin-til-glutaminsyresubstitution ved codon 600 (V600E). Vildtype-BRAF og mutant-DNA targetspecifikke fluorescerende TaqMan-prober binder til hhv. vildtype- og mutantsekvenserne. Vildtype- og mutantsekvenserne detekteres ved hjælp af en dedikeret optisk kanal for hver sekvens.

Amplifikation af target

Thermus-art Z05 DNA-polymerase anvendes til amplifikation af target. Først opvarmes PCR-reaktionsblandingen for at denaturere det genomiske DNA og blotlægge primerens target-sekvenser. Når blandingen afkøler, bindes upstream- og downstream-primerne til DNA-target-sekvenserne. Z05 DNA-polymerasen forlænger hver bundne primer under tilstedeværelsen af en divalent metalion og overskydende dNTP'er og syntetiserer dermed en anden DNA-streng. Dette afslutter første cyklus af PCR, der giver en dobbeltstrenget DNA-kopi af den målrettede 116-baseparregion for BRAF-genet. Denne proces gentages et antal gange, hvor mængden af amplikon-DNA fordobles for hver cyklus. Amplifikation af BRAF-genet foregår kun i området mellem primerne.

Automatiseret real-time detektion

cobas BRAF-testen anvender real-time PCR-teknologi. Hver target-specifikke oligonukleotide probe i reaktionen mærkes med en fluorescensfarve, som fungerer som rapportfarvestof, og med et quencher-molekyle, der absorberer (dæmper) fluorescensfrigivelsen fra rapportfarvestoffet i den intakte probe. Under hver amplifikationscyklus bindes proben, som er komplementær til den enkeltstrengete DNA-sekvens i amplikonet, og spaltes derefter af 5'-3'-nukleaseaktiviteten i Z05 DNA-polymerasen. Når rapportfarvestoffet er separeret fra quencher-farvestoffet af denne nukleaseaktivitet, kan fluorescens med en karakteristisk bølgelængde måles, når rapportfarvestoffet exciteres af det korrekte lysspektrum. Der anvendes to forskellige rapportfarvestoffer til at mærke den target-specifikke vildtype-BRAF-probe (WT) og BRAF V600E-mutationsproben. Amplifikation af de to BRAF-sekvenser kan detekteres uafhængigt i en enkelt reaktionsbrønd ved at måle fluorescensen ved de to karakteristiske bølgelængder i dedikerede optiske kanaler.

Selektiv amplifikation

Selektiv amplifikation af target-nukleinsyren fra prøven opnås i **cobas** BRAF-testen ved hjælp af AmpErase-enzym (uracil-N-glycosylase) og deoxyuridintrifosfat (dUTP).¹³ AmpErase-enzymet registrerer og katalyserer nedbrydningen af DNA-streng, der indeholder deoxyuridin, men ikke DNA, der indeholder thymidin. Deoxyuridin findes ikke i naturligt forekommende DNA, men findes altid i amplikon på grund af brugen af dUTP som én af nukleotidtrifosfaterne i reaktionsmixreagenset. Derfor er det kun amplikonet, der indeholder deoxyuridin. Deoxyuridin gør det kontaminerende amplikon modtageligt for nedbrydning med AmpErase-enzym før amplifikationen af target-DNA'et. AmpErase-enzymet, der findes i reaktionsmixreagenset, katalyserer spaltningen af deoxyuridinholdigt DNA ved deoxyuridin-residues ved at åbne deoxyribosekæden ved positionen C1. Ved opvarmning i den første termiske cyklus ved alkalisk pH brækker amplikonets DNA-kæde ved positionen for deoxyuridin, og dermed kan DNA'et ikke amplificeres. AmpErase-enzymet er inaktivt ved temperaturer over 55 °C, dvs. i de termiske cyklusser, og derfor ødelægges target-amplikonet ikke.

REAGENSER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 tests (M/N: 05985595190)			
Komponenter i kittet	Indholdsstoffer i reagenser	Antal pr. kit	Sikkerhedssymbol og advarsel ^a
RXNMIX (reaktionsmix)	Tricinbuffer Kaliumacetat Kaliumhydroxid Glycerol Tween 20 EDTA 5 % dimethylsulfoxid < 0,09 % dNTP'er < 0,10 % Z05 DNA-polymerase (mikrobiel) < 0,10 % AmpErase-enzym (uracil-N-glycosylase) (mikrobielt) < 0,003 % oligonukleotid aptamer 0,08 % natriumazid	3 × 0,16 ml	Ikke relevant
MGAC (Magnesiumacetat)	Magnesiumacetat 0,09 % natriumazid	3 × 0,15 ml	Ikke relevant
BRAF OM (BRAF Oligo Mix)	Tris-HCl-buffer EDTA 0,09 % natriumazid Poly rA RNA (syntetisk) < 0,01 % upstream- og downstream-BRAF-primere < 0,01 % fluorescerende BRAF-prober	3 × 0,13 ml	Ikke relevant
BRAF MUT (BRAF-mutantkontrol)	Tris-HCl-buffer EDTA Poly rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiel) indeholdende BRAF-mutantsekvens < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiel) indeholdende vildtype-BRAF-sekvens	2 × 0,13 ml	Ikke relevant
BRAF WT (Vildtype-BRAF-kontrol)	Tris-HCl-buffer EDTA Poly rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiel) indeholdende vildtype-BRAF-sekvens	2 × 0,13 ml	Ikke relevant
DNA SD (DNA-prøvediluent)	Tris-HCl-buffer 0,09 % natriumazid	2 × 1 ml	Ikke relevant

^a Produktsikkerhedsmærkningen følger primært EU GHS-retningslinjerne.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

A. TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTIK.

- B. Denne test er til brug med formalinfikseret paraffinindstøbte vævsprøver.
- C. Brug ikke mundpipettering.
- D. Der må ikke spises, drikkes eller ryges i laboratoriets arbejdsområder.
- E. Undgå mikrobiel og DNA-kontaminering af reagenser.
- F. Reagenser og affald skal bortskaffes i overensstemmelse med nationale, regionale og lokale bestemmelser.
- G. Brug ikke kittene efter deres udløbsdato.
- H. Reagenser fra forskellige lot eller kit må ikke blandes.
- I. Der kan rekvireres sikkerhedsdatablade (SDS) ved henvendelse til det lokale Roche-kontor.
- J. Der skal bæres handsker, og de skal skiftes mellem håndtering af prøver og **cobas**[®] 4800-reagenser for at forhindre kontaminering.
- K. For at undgå kontamination af arbejds-Master-Mix'et med DNA-prøver bør amplifikation og detektion foretages i et område, der er adskilt fra DNA-isolering. Arbejdsområdet for amplifikation og detektion bør gøres grundigt rent, før der arbejdes med Master Mix-forberedelse. For korrekt rengøring bør alle overflader, inklusive racks og pipetter, aftørres grundigt med en opløsning på 0,5 % natriumhypoklorit* og derefter med en opløsning på 70 % ethanol.
*** Bemærk! Almindeligt tilgængeligt flydende blegemiddel til husholdningsbrug indeholder typisk natriumhypoklorit med en koncentration på 5,25 %. En 1:10 fortynding af blegemidlet giver en 0,5 % opløsning af natriumhypoklorit.**
- L. Prøver skal håndteres som smittefarligt materiale i overensstemmelse med forskrifterne for sikkerhed i laboratoriet, som f.eks. 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** indeholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- og kobber-installationer og danne højeksplosive metalazider. Hvis natriumazidholdige opløsninger hældes ud i laboratorievasken, skal afløbet skylles med store mængder koldt vand for at undgå ophobning af azider.
- N. Anvend beskyttelsesbriller, særligt arbejdstøj og engangsbeskyttelseshandsker ved håndtering af alle reagenser. Undgå kontakt med huden, øjnene og slimhinderne. Ved kontakt skylles straks med store mængder vand. Der kan opstå ætsninger, hvis området ikke behandles. Hvis der spildes, skal der fortyndes med vand, før det tørres op.
- O. Alle engangsartikler må kun bruges én gang. De må ikke genbruges.
- P. Anvend ikke engangsartikler efter deres udløbsdato.
- Q. Anvend ikke natriumhypokloridopløsning (blegemiddel) til rengøring af **cobas z** 480-analyseinstrumentet. Rengør **cobas z** 480-analyseinstrumentet i henhold til de procedurer, der er beskrevet i den brugermanual til **cobas**[®] 4800-systemet eller bruger-assistance til **cobas**[®] 4800-systemet.
- R. Se brugermanualen til **cobas**[®] 4800-systemet eller brugerassistancen til **cobas**[®] 4800-systemet for yderligere oplysninger om advarsler, forholdsregler og procedurer til reduktion af risikoen for kontaminering for **cobas z** 480-analyseinstrumentet.
- S. Det anbefales at bruge sterile engangspipetter og DNase-frie pipettespidser.

KRAV TIL OPBEVARING OG HÅNDTERING

- A. Reagenser må ikke nedfryses.
- B. Opbevar **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT** og **DNA SD** ved 2-8 °C. Efter åbning kan reagenserne holde sig i op til 4 anvendelser over 60 dage eller indtil udløbsdatoen, afhængig af hvad der kommer først.
- C. **BRAF OM** og arbejds-Master Mix'et (forberedes ved at tilsætte **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**) skal beskyttes mod længerevarende udsættelse for lys.
- D. Arbejds-Master Mix'et (forberedes ved at tilsætte **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**) skal opbevares ved 2-8 °C på et mørkt sted. De forberedte prøver og kontroller skal tilsættes inden 1 time efter forberedelsen af arbejds-Master Mix.
- E. Behandlede prøver (oprenset DNA) er holdbare i op til 24 timer ved 15 °C til 30 °C eller op til 14 dage ved 2 °C til 8 °C eller op til 60 dage ved -15 °C til -25 °C eller efter at have gennemgået 3 nedfrysninger/optøninger ved opbevaring ved -15 °C til -25 °C. Oprenset DNA skal amplificeres inden for de anbefalede opbevaringsperioder eller før udløbsdatoen for det **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit, der bruges til oprensning af DNA'et, afhængigt af hvilken der kommer først.
- F. Amplifikation skal påbegyndes inden for 1 time fra tidspunktet, de behandlede prøver og kontroller tilsættes arbejds-Master Mix'et (forberedes ved tilsætning af **BRAF OM** og **MGAC** til **RXNMIX**).

MEDFØLGENDE MATERIALER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

(M/N: 05985595190)

BRAF

24 tests

RXNMIX

(reaktionsmix) (låg med beige farvet knap)

MGAC

(magnesiumacetat) (låg med gul knap)

BRAF OM

(BRAF Oligo Mix) (sort låg med hvid knap)

BRAF MUT

(BRAF-mutantkontrol) (låg med rød knap)

BRAF WT

(BRAF-vildtypekontrol) (låg med blå knap)

DNA SD

(DNA-prøvediluent) (låg med lille knap)

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
- Microwell-plade (AD-plade) og forseglingsfilm til **cobas®** 4800-systemet (Roche M/N: 05232724001)
- Justerbare pipetter*: (kapacitet 10 µl, 20 µl, 200 µl og 1000 µl) med aerosolbarriere- eller DNase-fri "positive displacement"-spidser
- Mikrocentrifugerør med hængselåg (1,5 ml rør, der er sterile, RNase/DNase-fri og i PCR-kvalitet)
- Spektrofotometer til måling af DNA-koncentration**
- Vortex-mixer**
- Mikrocentrifugerør-racks
- Engangsbeskyttelseshandsker, uden talkum
- Fryseenhed med mulighed for opbevaring ved -25 °C til -15 °C

* Pipetter bør vedligeholdes i henhold til producentens anvisninger og må højst afvige 3 % fra den angivne volumen. Der skal anvendes aerosolbarriere- eller DNase-fri "positive displacement"-spidser, hvor det er angivet, for at undgå nedbrydning af prøverne og krydskontaminering.

** Alt udstyr skal vedligeholdes korrekt i henhold til producentens anvisninger.

Instrumenter og software

- **cobas z** 480-analyseinstrument
- **cobas®** 4800 SR2-systemkontrolenhed med Windows XP-billede
- **cobas®** 4800 SR2-systemsoftware, version 2.0 eller nyere
- BRAF-analysepakkesoftware, version 1.0 eller nyere
- Stregkodelæser (Roche M/N: 05339910001)
- Printer HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

UDTAGNING, TRANSPORT OG OPBEVARING AF PRØVER

Bemærk! Alle prøver skal håndteres som potentielt smittefarlige.

A. Prøvetagning

FFPET-prøver er blevet valideret til brug med **cobas** BRAF-testen.

B. Transport af prøver

FFPET-prøver kan transporteres ved 15-30 °C. Transport af FFPET-prøver skal overholde nationale, regionale og lokale bestemmelser for transport af ætiologiske stoffer.¹⁶

C. Opbevaring af prøver

Stabiliteten af FFPET-prøver, der opbevares ved 15-30 °C i op til 12 måneder efter prøvetagningen, er bekræftet. 5 µm FFPET-snit, der er anbragt på objektglas, kan opbevares ved 15-30 °C i op til 60 dage.

BRUGSANVISNING

Bemærk! Alle reagenser, på nær RXNMIX, MGAC og BRAF OM, skal have den omgivende temperatur før brug. RXN MIX, MGAC og BRAF OM kan tages direkte fra opbevaringen ved 2-8 °C til forberedelse af arbejds-Master Mix'et.

Bemærk! Kun melanom- og PTC-FFPET-snit med 5 µm tykkelse, der indeholder mindst 50 % tumorceller, kan anvendes i cobas BRAF-testen. Enhver prøve med mindre end 50 % tumorceller bør makrodissekteres efter afparaffinering.

Bemærk! Se brugermanualen til cobas® 4800-systemet eller brugerassistenten til cobas® 4800-systemet for at få en detaljeret betjeningsvejledning til cobas z 480-analyseinstrumentet.

Kørselsstørrelse

cobas BRAF-testkittet er designet til kørsel med minimum 3 prøver plus kontroller, og op til maksimalt 24 prøver plus kontroller. Der kan køres færre end 3 prøver plus kontroller på en gang, men det kan resultere i en utilstrækkelig volumen af reagenser til kørsel af i alt 24 prøver plus kontroller med kittet. cobas BRAF-testen indeholder tilstrækkeligt mange reagenser til 8 kørsler a 3 prøver plus kontroller. Hver testkørsel skal inkludere mindst én bestemmelse af cobas BRAF-mutant kontrol [BRAF MUT] og én bestemmelse af cobas BRAF-vildtypekontrol [BRAF WT] (se afsnittet "Kvalitetskontrol").

Arbejdsgang

Bemærk! cobas BRAF-testen kan anvendes i op til 24 prøver i en kørsel.

Bemærk! For at maksimere reagensbrugen bør en testkørsel inkludere minimum tre (3) patientprøver plus kontroller.

DNA-isolering

DNA isoleres fra FFPET-prøver ved hjælp af cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Makrodissektion

Hvis prøven indeholder mindre end 50 % tumorindhold pr. område, skal prøven makrodissekteres som en del af prøveforberedelsen.

DNA-kvantificering

Bemærk! Måling af DNA-koncentrationen bør foretages umiddelbart efter DNA-isoleringsproceduren og før opbevaring.

- Bland hver DNA-stock-opløsning på en vortex-mixer i 5 sekunder før kvantificering.
- Kvantificér DNA ved hjælp af et spektrofotometer i henhold til producentens anvisninger. Brug DNA EB fra cobas® DNA Sample Preparation Kit som blindprøve for instrumentet. Det er nødvendigt med gennemsnitligt 2 konsistente aflæsninger. De to målinger skal være inden for ±10 % fra hinanden, når DNA-koncentrationsaflæsningerne er $\geq 20,0$ ng/µl. For DNA-koncentrationsaflæsninger $< 20,0$ ng/µl skal de to målinger være inden for $\pm 2,0$ ng/µl.
- DNA-stock-opløsningskoncentrationen skal være ≥ 5 ng/µl for at kunne foretage cobas BRAF-testen.

Bemærk! Hver DNA-stock-opløsning skal have en minimumskoncentration på 5 ng/µl for at kunne foretage cobas BRAF-testen. Hvis koncentrationen af en DNA-stock-opløsning er < 5 ng/µl, skal proceduren for afparaffinering, DNA-isolering og DNA-kvantificering for den pågældende prøve gentages ved hjælp af to 5 µm FFPET-snit. For prøver, der er placeret på objektglas, kombineres vævet fra begge snit i ét rør efter afparaffinering, herefter nedsænkes vævet i TLB og PK fra cobas® DNA Sample Preparation Kit, og der foretages DNA-isolering og -kvantificering. For prøver, der ikke er placeret på objektglas, kombineres vævet fra begge snit i ét rør, hvorefter der foretages afparaffinering samt DNA-isolering og -kvantificering. Hvis DNA-stock-opløsningen stadig er < 5 ng/µl, skal man anmode om et nyt FFPET-prøvesnit fra rekvirenten.

Bemærk! Behandlede prøver (oprenset DNA) er holdbare i op til 24 timer ved 15 °C til 30 °C eller op til 14 dage ved 2 °C til 8 °C eller op til 60 dage ved -15 °C til -25 °C eller efter at have gennemgået 3 nedfrysninger/optøninger ved opbevaring ved -15 °C til -25 °C. Oprenset DNA skal amplificeres inden for de anbefalede opbevaringsperioder eller før udløbsdatoen for det cobas® DNA Sample Preparation Kit, der bruges til oprensning af DNA'et, afhængigt af hvilken der kommer først.

AMPLIFIKATION OG DETEKTION

Bemærk! For at undgå kontamination af arbejds-Master-Mix'et med DNA-prøver bør amplifikation og detektion foretages i et område, der er adskilt fra DNA-isolering. Arbejdsområdet for amplifikation og detektion bør gøres grundigt rent, før der arbejdes med Master Mix-forberedelse. For korrekt rengøring bør alle overflader, inklusive racks og pipetter, aftørres grundigt med en opløsning på 0,5 % natriumhypoklorit og derefter med en opløsning på 70 % ethanol. Almindeligt tilgængeligt flydende blegemiddel til husholdningsbrug indeholder typisk natriumhypoklorit med en koncentration på 5,25 %. En 1:10 fortynding af blegemidlet giver en 0,5 % opløsning af natriumhypoklorit.

Opsætning af instrumentet

Se brugermanualen til **cobas**[®] 4800-systemet eller brugerassistanzen til **cobas**[®] 4800-systemet for detaljerede instruktioner vedrørende opsætningen af **cobas z** 480-analyseinstrumentet.

Opsætning af testrækkefølge

Se brugermanualen til **cobas**[®] 4800-systemet eller brugerassistanzen til **cobas**[®] 4800-systemet for at få trin til **cobas** BRAF-testarbejdsgangen.

Fortyndingsberegning for prøve-DNA-stock-opløsningen

Der køres kun én amplifikation/detektion pr. prøve ved brug af 25 µl af en 5 ng/µl fortynding af DNA-stock-opløsning (i alt 125 ng). Nedenstående instruktioner indeholder en beskrivelse af, hvordan du forbereder minimum 35 µl fortyndet DNA-stock-opløsning ved 5 ng/µl, afhængigt af DNA-stock-opløsningens startkoncentration. Det sikrer, at hver enkelt prøve bruger minimum 5 µl DNA-stock-opløsning for at forhindre variation, der ellers kan forekomme ved pipettering af mindre prøvemængder.

Fortyndingsberegning for prøve-DNA-stock-opløsning ved koncentrationer fra 5 ng/µl til 35 ng/µl

Bemærk! DNA-stock-opløsninger fra prøver bør fortyndes umiddelbart for amplifikation og detektion.

Bemærk! Der køres kun én amplifikation/detektion pr. prøve ved brug af 25 µl af en 5 ng/µl fortynding af DNA-stock-opløsning (i alt 125 ng).

- A. Den nødvendige mængde DNA-stock-opløsning bestemmes for hver prøve ved hjælp af følgende formel:
Nødvendig volumen af DNA-stock-opløsning = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div \text{DNA-stock-opløsningskoncentration i ng/µl}$
- B. Den nødvendige mængde DNA-prøvediluent (**DNA SD**) fastslås for hver prøve ved hjælp af følgende formel:
Nødvendig volumen af DNA SD i µl = $(35 \text{ µl} - \text{nødvendig volumen af DNA-stock-opløsning i µl})$
- Eksempel:
DNA-stock-opløsningskoncentration = 21 ng/µl
- A. Nødvendig volumen af DNA-stock-opløsning = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$
- B. Nødvendig volumen af DNA SD i µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Fortyndingsberegning for prøve-DNA-stock-opløsning ved koncentrationer > 35 ng/µl

Bemærk! DNA-stock-opløsninger fra prøver bør fortyndes umiddelbart for amplifikation og detektion.

Bemærk! Der køres kun én amplifikation/detektion pr. prøve ved brug af 25 µl af en 5 ng/µl fortynding af DNA-stock-opløsning (i alt 125 ng).

- A. Ved DNA-stock-opløsningskoncentrationer > 35 ng/µl anvendes følgende formel til at beregne mængden af DNA-prøvefortynder (**DNA SD**), der er nødvendig til at forberede mindst 35 µl fortyndet DNA-stock-opløsning. Dette er for at sikre, at hver prøve anvender minimum 5 µl DNA-stock-opløsning.
Nødvendig volumen af DNA SD i µl = $[(5 \text{ µl DNA-stock-opløsning} \times \text{DNA-stock-opløsningskoncentration i ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl}$
- B. Anvend den beregnede volumen **DNA SD** til at fortynde 5 µl DNA-stock-opløsning.
- Eksempel:
DNA-stock-opløsningskoncentration = 42 ng/µl
- A. Nødvendig volumen af DNA SD i µl = $[(5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$
- B. Anvend den beregnede volumen **DNA SD** til at fortynde 5 µl DNA-stock-opløsning.

Prøvefortynding

- A. Forbered det relevante antal 1,5 ml mikrocentrifugerør til prøvefortyndinger af DNA-stock-opløsning ved at mærke dem med den rette prøveidentifikation i prøvetilføjesområdet.
- B. Brug en pipette med en aerosolresistent pipettespids, og pipetter den beregnede volumen af DNA-prøvediluent (**DNA SD**) i hvert mærkede prøverør.
- C. Bland hver prøve-DNA-stock-opløsning på en vortex-mixer i 10 sekunder.

- D. Brug en pipette med en aerosolresistent pipettespids, og pipetter forsigtigt den beregnede volumen af hver prøve-DNA-stockopløsning i det dertil mærkede rør indeholdende **DNA SD**. Brug en ny pipettespids til hver prøve.
- E. Sæt låg på, og bland hver fortyndede prøve-DNA-stockopløsning på en vortex-mixer i 10 sekunder.
- F. Skift handsker.

Forberedelse af arbejds-Master Mix (MMX)

Bemærk! BRAF Oligo Mix og arbejds-MMX er lysfølsomme. Alle åbne blandinger af BRAF OM og arbejds-MMX bør beskyttes mod længerevarende udsættelse for lys.

- A. Beregn den nødvendige volumen af **RXNMIX** ved hjælp af følgende formel:
Nødvendig volumen af **RXNMIX** = (antal prøver + 2 kontroller + 1) × 10 µl
 - B. Beregn den nødvendige volumen af **BRAF OM** ved hjælp af følgende formel:
Nødvendig volumen af **BRAF OM** = (antal prøver + 2 kontroller + 1) × 8 µl
 - C. Beregn den nødvendige volumen af **MGAC** ved hjælp af følgende formel:
Nødvendig volumen af **MGAC** = (antal prøver + 2 kontroller + 1) × 7 µl
- Tabel 1 kan anvendes til at bestemme volumenerne for hvert reagens, der er nødvendig til forberedelse af arbejds-MMX'er, baseret på antallet af prøver i kørslen.

Tabel 1

		Volumener af reagenser nødvendige til arbejds-MMX									
		Antal 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
Volumen i alt µl		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Antal prøver + 2 kontroller + 1

- D. Fjern det relevante antal **RXNMIX**-, **BRAF OM**- og **MGAC**-rør fra opbevaringen ved 2-8 °C. Bland hvert reagens i 5 sekunder for at indsamle væsken i bunden af røret før brug. Mærk et sterilt mikrocentrifugerør til arbejds-Master Mix'et (MMX).
 - E. Tilsæt den beregnede volumen af **RXNMIX** til det mærkede MMX-rør.
 - F. Tilsæt den beregnede volumen af **BRAF OM** til det mærkede MMX-rør.
 - G. Tilsæt den beregnede volumen af **MGAC** til det mærkede MMX-rør.
 - H. Bland røret i 5 sekunder på en vortex-mixer for at sikre korrekt blanding.
- Bemærk! Brug kun microwell-plade (AD-plade) og forseglingsfilm til cobas® 4800-systemet (Roche M/N: 05232724001).**
- I. Tilsæt forsigtigt 25 µl arbejds-MMX til hver reaktionsbrønd på AD-pladen, som er nødvendig til kørslen. Lad ikke pipettespiden røre pladen uden for brønden.

Tilføjelse af kontroller og prøver

- A. Tilsæt 25 µl **BRAF MUT**-kontrol til brønd **A01** på AD-pladen, og bland grundigt ved at bruge pipetten til at aspirere og dispensere minimum to gange i brønden.
- B. Brug en ny pipettespids, og tilsæt 25 µl **BRAF WT**-kontrol til brønd **B01** på AD-pladen, og bland grundigt ved at bruge pipetten til at aspirere og dispensere minimum to gange i brønden.

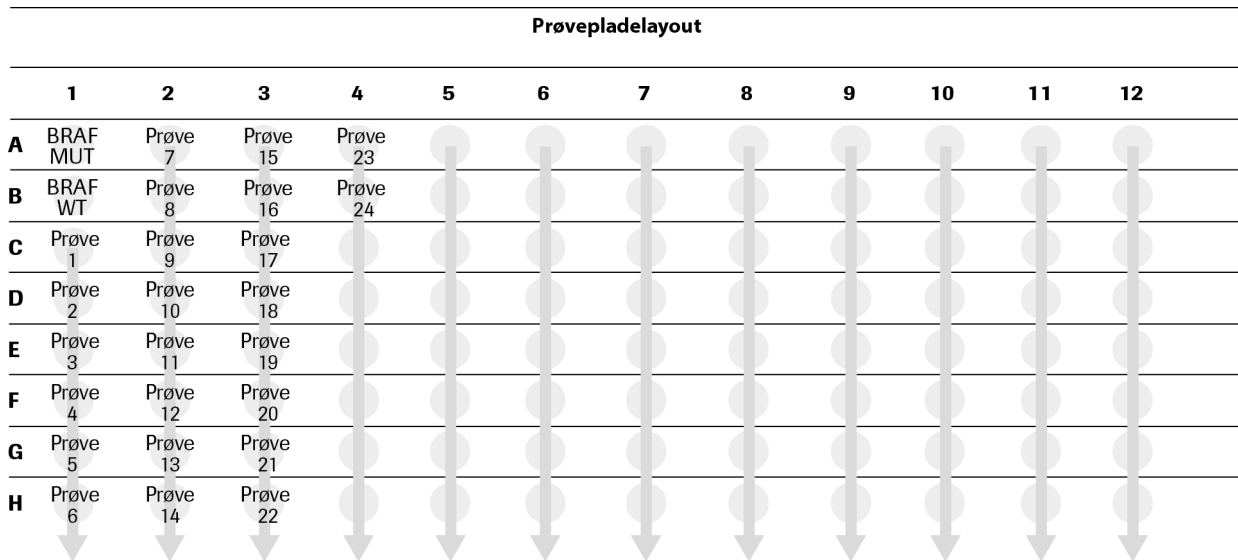
Bemærk! Hver kørsel skal indeholde både en BRAF MUT-kontrol i position A01 og en BRAF WT-kontrol i position B01. I modsat fald ugyldiggøres kørslen af cobas z 480-analyseinstrumentet.

Bemærk! Skift handsker efter behov for at beskytte mod prøve-til-prøve-kontamination og kontamination af ydersiden af PCR-reaktionsrør.

- C. Brug en pipette med en aerosolresistent spids, og tilsæt 25 µl fortyndet prøve-DNA i den rette brønd, der indeholder arbejds-MMX'et. Start fra position **C01** på AD-pladen, og følg templateen i Figur 1 nedenfor. Bland reaktionen, og brug pipetten til at aspirere og dispensere minimum to gange i brønden. Sørg for, at al væske er samlet i bunden af brønden.

Bemærk! Prøve-DNA og kontroller bør tilføjes AD-pladen inden for 1 time efter forberedelsen af arbejds-Master Mix'et (MMX).

Figur 1



D. Fortsæt, indtil alle testprøver er blevet tilsat AD-pladen.

E. Tildæk AD-pladen med forseglingsfilm (leveres sammen med pladerne). Brug hjælpespartlen til forseglingsfilm for at sikre, at forseglingsfilmen sidder godt fast på AD-pladen.

F. Kontrollér, at al væske er samlet i bunden af hver brønd, før amplifikation og detektion startes.

Bemærk! Amplifikation og detektion bør startes inden for 1 time efter tilsætning af den første prøve-DNA og kontroller til arbejds-MMX'et.

Start af PCR

Se brugermanualen til **cobas**[®] 4800-systemet eller brugerassistancen til **cobas**[®] 4800-systemet for at få en detaljeret vejledning i trinene i BRAF-arbejdsgangen.

Fortolkning af resultater

Bemærk! Al validering af kørsler og prøver udføres af cobas[®] 4800 BRAF AP-softwaren.

Bemærk! En valid kørsel kan indeholde både valide og invalide prøveresultater.

Hvis kørslen er valid, skal prøveresultaterne fortolkes som vist i Tabel 2.

Tabel 2
Fortolkning af prøveresultater

cobas BRAF-testresultat	Fortolkning
Mutation Detected	V600-mutation detekteret i BRAF codon 600-stedet i exon 15
Mutation Not Detected eller No Mutation Detected*	V600-mutation ikke detekteret i BRAF codon 600-stedet i exon 15
Invalid	Resultatet er invalidd. Gentag testen af prøver med invalide resultater ved at følge instruktionerne, der er beskrevet i afsnittet Gentagelse af test af prøver med invalide resultater nedenfor.
Failed	Kørsel mislykket på grund af hardware- eller softwarefejl

* Resultatet "Mutation Not Detected" (Mutation ikke detekteret) eller "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekteret) udelukker ikke tilstedeværelsen af en mutation i BRAF codon 600-stedet, da resultaterne afhænger af det antal mutant sekvens-kopier, der findes i prøven, og kan påvirkes af prøveintegriteten, mængden af isoleret DNA og tilstedeværelsen af interfererende stoffer.

Gentagelse af test af prøver med invalide resultater

- A. Gentag fortynding af den ugyldige prøve-DNA-stock-opløsning fra procedurerne **Fortyndingsberegning af prøve-DNA-stock-opløsningen** og **Prøvefortynding** i afsnittet **AMPLIFIKATION OG DETEKTION**.

Bemærk! Hvis der ikke er tilstrækkeligt med prøve-DNA-stock-opløsning tilbage til at udføre en ny fortynding af DNA-stock-opløsning, skal man indsamle et nyt 5-µm-vævssnit og genisolere DNA ved hjælp af cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) og derefter fortsætte med trin B herunder.

- B. Efter at have foretaget DNA-stock-opløsningsfortynding til 5 ng/µl, som beskrevet i **Prøvefortynding**, skal foretages en ekstra 1:2-fortynding ved at tage 20 µl af den fortyndede DNA-stock-opløsning og tilsætte 20 µl DNA-prøvediluent (**DNA SD**).
- C. Fortsæt med **Forberedelse af arbejds-Master Mix (MMX)** og resten af amplifikations- og detektionsproceduren.

Bemærk! Hvis prøven forbliver invalid efter reanalysering med en 1:2-fortynding, gentages hele testproceduren for den pågældende prøve ved at starte med cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) ved hjælp af et nyt 5-µm FFPET-snit. Standardvolumenen på 25 µl af DNA ved 5 ng/µl (uden yderligere fortynding) bør anvendes til amplificering og detektion.

KVALITETSKONTROL

Hver kørsel omfatter **cobas** BRAF-mutant kontrol (**BRAF MUT**) og vildtypekontrol (**BRAF WT**). En kørsel er gyldig, hvis kontrolbrønden **BRAF MUT (A01)** og kontrolbrønden **BRAF WT (B01)** har en gyldig kontrolstatus. Hvis kontrollen **BRAF MUT** eller **BRAF WT** er ugyldig, skal kørslen gentages. Forbered en frisk fortynding af den tidligere isolerede prøve-DNA-stock-opløsning for at opsætte en ny AD-plade med kontrol til amplifikation og detektion.

BRAF-mutantkontrol

Resultatet af **BRAF MUT**-kontrollen skal være gyldigt ("Valid"). Hvis resultaterne af **BRAF MUT**-kontrollen konstant er invalide, skal Roche kontaktes for at få teknisk hjælp.

BRAF-vildtypekontrol

Resultatet af **BRAF WT**-kontrollen skal være gyldigt ("Valid"). Hvis resultaterne af **BRAF WT**-kontrollen konstant er invalide, skal Roche kontaktes for at få teknisk hjælp.

FORHOLDSREGLER VED PROCEDURERNE

Som ved alle testprocedurer er det vigtigt med god laboratorieteknik, for at analysen skal kunne fungere korrekt. På grund af PCR-baserede tests høje analytiske sensitivitet skal man være omhyggelig med at undgå, at reagenser og amplifikationsblandinger kontamineres.

BEGRÆNSNINGER VED PROCEDURERNE

1. Test kun de angivne prøvetyper. **cobas** BRAF-testen er kun blevet valideret til brug med melanom- og PTC-FFPET-prøver.
2. **cobas** BRAF-testen er kun blevet valideret ved hjælp af **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190) til ekstrahering af genomisk DNA.
3. Detektionen af en mutation er afhængig af det antal mutant sekvens-kopier, der findes i prøven, og kan påvirkes af prøveintegriteten, mængden af isoleret DNA og tilstedeværelsen af interfererende stoffer.
4. Pålidelige resultater er afhængige af korrekte procedurer for prøvefiksering, -transport, -opbevaring og -behandling. Følg procedurerne i dette produktpakningsindlæg og i brugermanualen til **cobas®** 4800-systemet eller brugerassistancen til **cobas®** 4800-systemet.
5. Tilsætningen af AmpErase-enzym til **cobas** BRAF-testens reaktionsmix aktiverer den selektive amplifikation af target-DNA. Kontaminering fra reagenser kan dog kun undgås med god laboratoriepraksis og nøje overholdelse af de procedurer, der er angivet i dette pakningsindlæg.
6. Dette produkt må kun anvendes af medarbejdere, som er uddannet i brugen af PCR-teknikker og brugen af **cobas®** 4800-systemet.
7. Kun **cobas®** 4800-analyseinstrumentet er blevet valideret til brug med dette produkt. Der er ikke andre PCR-systemer, der er blevet valideret med dette produkt.
8. På grund af naturlige forskelle mellem teknologier anbefales det, at brugeren udfører metodekorrelationsundersøgelser i laboratoriet for at påvise teknologiske forskelle, før der skiftes fra én teknologi til en anden.
9. Effekten fra andre potentielle variabler, såsom prøvefikseringsvariabler, er ikke blevet evalueret.
10. Selvom det er sjældent, kan mutationer og variationer i de BRAF-genområder, der er omfattet af primere eller prober, som bruges i **cobas** BRAF-testen, forårsage fejl ved amplifikation af BRAF V600-allel eller detektering af mutation i codon 600.
11. Forekomst af PCR-hæmmere kan medføre falsk-negative eller invalide resultater.
12. Melanin er en kendt hæmmer af PCR-reaktioner. DNA-prøveforberedelseskittet fjerner melanin fra prøven under ekstrahering, men melanin i en prøve kan muligvis stadig forårsage invalide resultater. Hvis der er mistanke om melaninhæmning, foreslås det at gentage testen ved hjælp af en 1:2 fortynding som beskrevet i "Gentagelse af test af prøver med invalide resultater".
13. **cobas** 4800 BRAF V600-mutationstesten viser begrænset krydsreaktivitet med ikke-V600E-mutante prøver (V600K, V600D og V600E2). Se afsnittet "Melanom – Evaluering af ikke-klinisk performance" for at få flere oplysninger.
14. FFPET-prøver med nedbrudt DNA kan påvirke testens evne til at detektere mutation.
15. **cobas** 4800 BRAF-mutationstesten er en kvalitativ test. Testen er ikke beregnet til kvantitative målinger af mutation.

I. MELANOM

EVALUERING AF IKKE-KLINISK PERFORMANCE

I forbindelse med de ikke-kliniske studier, der er beskrevet nedenfor, blev tumorindholdet i % vurderet af et patologivurderingspanel, og melaninindholdet blev vurderet af et patologivurderingspanel og en intern melaninbestemmelsesanalyse. Bidirektional Sanger-sekventering blev benyttet til udvælgelse af prøver til test. Det procentvise mutationsniveau blev fastslået vha. 454-sekventering (kvantitativ højparallel pyrosekventeringsmetode).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet – Detektionsgrænse (LoD)

En minimummængde af DNA-input, der producerer 95 % korrekte resultater blev vurderet vha. fortyndingspaneler, der blev forberedt fra tre typer prøver:

- Prøveblandinger, der er forberedt ved at blande DNA-stock-opløsninger, som er indsamlet fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver og FFPET-prøver af vildtype-BRAF for at opnå bestemte mutationsniveauer.
- Individuelle FFPET-DNA-stock-opløsninger, der er forberedt fra tre BRAF V600E-mutante FFPET-prøver.
- Cellelinjeblanding forberedt ved at blande DNA-stock-opløsning fra en BRAF V600E-mutant cellelinje og en vildtype-BRAF-cellelinje.

Alle prøver, der er anvendt i dette forsøg, er sekventeret ved hjælp af 454-sekventering for at kunne fastslå procenten af mutation i hver prøve.

Analytisk sensitivitet ved brug af prøveblandinger

BRAF V600E-mutant FFPET-prøve med DNA-stock-opløsninger blev blandet med vildtype-BRAF FFPET-prøve med DNA-stock-opløsninger for at opnå én prøve ved mutationsniveauet ~10 %, tre prøver ved ~5 % og én prøve ved ~3 %. Der blev også testet én vildtype-BRAF-prøve. Efter blanding blev mutationsniveauerne verificeret ved 454-sekventering. Hver af de fem prøveblandinger med V600E-mutation (men ikke vildtypeprøven) blev derefter fortyndet for at frembringe panelmedlemmerne, der er detaljeret i Tabel 3.

Tabel 3
Forberedelse af fortyndingspanelmedlemmer fra prøveblandinger

Blanding	Gennemsnitlig % mutation*	Mængde DNA i fortyndingspanelmedlemmer (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 vildtype)	- - -	125

* Gennemsnitlig procent mutation af blandingen testet med 454-sekventering.

** Mængde genomisk DNA indeholdt i hvert panelmedlem. 25 µl er prøveinputvolumenen for testen.

Otte (8) bestemmelser af hvert panelmedlem blev kørt ved hjælp af hvert af de 3 **cobas** BRAF-testkitlot (n = 24/panelmedlem). Tabel 4 viser sensitiviteten for hver FFPET-prøve, der blev fastlagt ved den laveste mængde DNA, der gav et BRAF V600E-niveau for "Mutation Detected" på mindst 95 % (grå rækker).

Tabel 4
Sensitivitet ved cobas BRAF-test ved brug af FFPET-blandinger

FFPET-blanding	Procent mutation ved 454-sekventering	Mængde DNA i panelmedlem	Niveau af "Mutation Detected" (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 % (vildtype)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Dette forsøg viser, at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutationen ved et mutationsniveau på ≥ 5 % mutation ved hjælp af standardinput på 125 ng/25 µl. Testens evne til at detektere mutation ved lavere DNA-inputniveauer viser, at prøverne kan indeholde nedbrudt DNA fra fikseringsprocessen, og mutationen kan stadig detekteres. Alle testresultater for vildtype-BRAF-prøven var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet ved brug af FFPET-prøver

For at bekræfte 5 %-mutationsdetektionen i patientprøver blev 48 individuelle 5 µm-snit fra hver af de 3 mutante BRAF V600E FFPET-prøver indeholdende mutationsniveauer på hhv. 6 %, 12 % og 4 % individuelt behandlet ved hjælp af 3 lot af **cobas**® DNA Sample Preparation Kit for at isolere DNA'et. For at vurdere effekten af melanin på testen, havde én prøve (6 % mutation) en høj melaninkoncentration. Serielle fortyndinger af DNA fra hvert snit blev forberedt for at producere et sæt på 6 panelmedlemmer som angivet i Tabel 5.

Tabel 5
Forberedelse af fortyndingspanelmedlemmer fra FFPET-prøver

FFPET-prøve	Prøveinformation		Mængde DNA i fortyndingspanelmedlemmer (ng/25 µl)
	Gennemsnitlig % V600E-mutation*	Pigmentation	
Prøve 1	6 %	Højt pigmenteret**	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

* Gennemsnitlig procent mutation af prøven fastslået ved 454-sekventering

** Højt pigmenteret baseret på visuel vurdering, melaninkoncentration = 0,17 µg/25 µl

*** NHP = ikke højt pigmenteret baseret på visuel vurdering

Seksten (16) bestemmelser af hvert panelmedlem blev kørt ved hjælp af hvert af de 3 **cobas** BRAF-testkitlot (n = 48/panelmedlem). Sensitiviteten for hver FFPET-prøve blev fastlagt ved den laveste mængde DNA, der gav et BRAF V600E-niveau for "Mutation Detected" på mindst 95 % (grå rækker). Resultaterne af undersøgelsen er vist i Tabel 6.

Tabel 6
Sensitivitet ved cobas BRAF-test ved brug af FFPET-prøver

FFPET-prøve	Procent mutation ved 454-sekventering	Mængde DNA i panelmedlem	Niveau af "Mutation Detected" (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 %

Dette forsøg viser, at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutationen i aktuelle FFPET-prøver ved et mutationsniveau på ≥ 5 % mutation ved hjælp af standardinput på 125 ng/25 µl. Testens evne til at detektere mutation ved lavere DNA-inputniveauer viser, at prøverne kan indeholde nedbrudt DNA fra fikseringsprocessen, og mutationen kan stadig detekteres. En højt pigmenteret prøve, der var inkluderet i undersøgelsen, viste sig ikke at påvirke testens sensitivitet.

Analytisk sensitivitet ved brug af cellelinjeblanding

DNA-stock-opløsninger fra to melanomcellelinjer [SK-MEL 28 (BRAF V600E-mutant) og SK-MEL 2 (vildtype-BRAF)] blev blandet for at opnå en prøve ved en mutation på 5 %, der blev verificeret af 454-sekventering. Der blev forberedt tre separate fortyndingspaneler indeholdende 125 ng/25 µl til 0 ng/25 µl DNA. Tyve (20) bestemmelser af hvert panelmedlem blev testet ved hjælp af 3 kitlot af **cobas** BRAF-test (60 bestemmelser i alt). Sensitiviteten blev fastlagt ved den laveste mængde DNA, der gav et BRAF V600E-niveau for "Mutation Detected" på mindst 95 % (grå række). Resultaterne af undersøgelsen er vist i Tabel 7.

Tabel 7
Sensitivitet ved cobas BRAF-test ved brug af cellelinjeblanding

Cellelinjeblanding	Gennemsnitlig procent mutation ved 454-sekventering	Mængde DNA i panelmedlem	Niveau af "Mutation Detected" (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 niveau for "Mutation Detected" på 95 % ved 3,9 ng/25 µl (1:32-fortynding) af det anbefalede DNA-input på 125 ng/25 µl. Dette indikerer, at testen vil detektere den testede BRAF V600E-mutation, når ~97 % af DNA'et er nedbrudt på grund af fikseringsprocessen, og det antages, at cellelinje-DNA'et indeholdt 100 % intakt og amplificerbart DNA.

Genomisk inputområde

Det anbefalede DNA-input for **cobas** BRAF-testen er 125 ng. Flere forskellige inputmængder for genomisk DNA kan være resultater af DNA-kvantificeringsfejl og/eller variationer i mængden af nedbrudt DNA. For at kunne evaluere effekterne af forskellige genomiske DNA-inputmængder, blev der udtrukket genomisk DNA fra 11 melanom-FFPET-prøver, som blev valgt ud fra mutationsstatus og pigmenteringsniveau, og de blev serielt fortyndet med prøveinput på 250 ng, 125 ng, 62,5 ng og 31,3 ng/25 µl. Alle 4 DNA-niveauer blev evalueret vha. 2 lot. De forventede resultater blev opnået for alle genomiske DNA-inputniveauer.

Minimalt tumorindhold

Treogtredive (33) BRAF V600E-mutantprøver blev testet for at fastlægge den minimale tumorandel, som var nødvendig for at kunne detektere BRAF V600E-mutationen i prøver med tumorindhold fra 5 % til 50 % uden makrodissektion. Et (1) snit fra hver prøve blev testet ved hjælp af **cobas** BRAF-testen.

cobas BRAF-testen detekterede helt korrekt alle BRAF V600E-mutantprøver med en minimum % mutant-DNA på over 5 %, og hvor minimumstumorindholdet var mindst 15 % som vist i Tabel 8. Prøver med mindre end 15 % tumorindhold og mindre end et 5 % mutationsniveau blev rapporteret som værende uden detekteret mutation. Yderligere 24-vildtypeprøver med tumorindhold fra 5 til 45 % blev også evalueret med den anbefalede DNA-inputkoncentration på 125 ng/25 µl. Alle vildtypeprøver blev korrekt fundet. Der kræves makrodissektion af prøver, der indeholder < 50 % tumorindhold efter område.

Tabel 8
Resultater af test af 33 BRAF V600E-prøver med forskelligt procenttumorindhold og procentmutation

Prøvenummer	Tumorindhold*	% Mutation	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	Tumorindhold*	% Mutation	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

** Tumorindholdet af prøven blev vurderet af en patolog ved at undersøge det første og sidste af de tolv tilstødende snit på 5 µm for hver prøve. Tumorindholdet i både første og sidste snit er vist (f.eks. 95 % / 95 %).*

Krydsreaktivitet

Krydsreaktiviteten ved **cobas** BRAF-testen blev evalueret ved at teste følgende prøvetyper:

- BRAF ikke-V600E-mutant melanom-FFPET-prøver med forskellige mutationsniveauer,
- Plasmider af BRAF ikke-V600E-mutationer,
- BRAF-homologe plasmider,
- Hudrelaterede mikroorganismer.

Krydsreaktivitet blev også evalueret ved at fastslå, hvorvidt tilstedeværelsen af homologe BRAF-plasmider eller hudrelaterede mikroorganismer interfererede med detektionen af BRAF V600E-mutationen.

BRAF ikke-V600E melanom-FFPET-prøver

Fjorten (14) melanom FFPET-prøver med BRAF ikke-V600E-mutationer (V600D, V600E2, V600R eller V600K) blev testet i tredobbelt bestemmelse med **cobas** BRAF-testen. Alle tre bestemmelser af otte BRAF ikke-V600E-prøver viste krydsreaktivitet med **cobas** BRAF-testen. Disse otte prøver var BRAF V600D-mutante (18 % mutation), BRAF V600E2-mutante (68 % mutation) eller BRAF V600K-mutante (mere end 30 % mutation). Der blev ikke observeret nogen krydsreaktivitet for den BRAF V600R-mutante prøve (23 % mutation) som vist i Tabel 9.

Tabel 9

Niveauer af detekteret mutation observeret for cobas BRAF-test for BRAF ikke-V600E-mutationer i FFPET-prøver

Prøvenummer	BRAF-mutationsstatus	Procent mutation	Tumorindhold*	Tumorstadie	Niveau af "Mutation Detected" (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 %

* Tumorindholdet af prøven blev vurderet af en patolog ved at undersøge det første og sidste af de tolv tilstødende snit på 5 µm for hver prøve. Tumorindholdet i både første og sidste snit er vist (f.eks. 95 % / 95 %).

Et fortyndingspanel bestående af 11 medlemmer med DNA-koncentrationer i området fra 5,0 ng/µl ned til 0,0049 ng/µl (svarende til mellem 125 og 0,1 ng af DNA i 25 µl inputvolumen for testen) blev forberedt, og hvert panelmedlem blev testet i tredobbelt bestemmelse for at fastslå den laveste mængde DNA, der gav en mutation detekteret på 100 % for de otte prøver, der blev fundet at krydsreagere i **cobas** BRAF-testen. Det laveste DNA-inputniveau før et tab i prøvekrydsreaktivitet, lå på mellem 0,5 ng/25 µl for en mutant BRAF V600K-prøve med en mutation på 69 % og 15,6 ng/25 µl for en mutant BRAF V600D-prøve med en mutation på 18 % (Tabel 10).

Tabel 10

Laveste DNA-input til detektering af prøvekrydsaktivitet for cobas BRAF-test

Prøvenummer	BRAF-mutationsstatus	Procent mutation	Laveste mængde DNA-input før tab af krydsreaktivitet (n = 3)
1	V600D	18 %	15,6 ng/25 µl
2	V600E2	68 %	7,8 ng/25 µl
3	V600K	31 %	3,9 ng/25 µl
4		35 %	3,9 ng/25 µl
5		39 %	3,9 ng/25 µl
6		36 %	2,0 ng/25 µl
7		62 %	3,9 ng/25 µl
8		69 %	0,5 ng/25 µl

BRAF ikke-V600E-plasmider

Plasmidfortyndingspaneler med mutationsniveauer mellem 5 % og 75 %, i en baggrund af vildtypeplasmid, blev forberedt for følgende ni BRAF ikke-V600E-mutationer: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K og V600R. Tre bestemmelser for hvert medlem af fortyndingspanelerne, der blev forberedt for hvert plasmid, blev foretaget ved hjælp af **cobas** BRAF-testen. Der blev set krydsreaktivitet i alle 3 bestemmelser af BRAF V600D-plasmid ved ≥ 10 % mutation, BRAF V600K-plasmid ved ≥ 35 % mutation og BRAF V600E2-plasmid ved ≥ 65 % mutation. Der blev ikke observeret nogen krydsreaktivitet med plasmider fra de seks andre testede BRAF-mutationer.

BRAF-homologe plasmider

Der blev forberedt prøver for tre BRAF-homologe plasmider (BRAF pseudogen, ARAF og RAF1), BRAF V600E-mutant plasmid og vildtype-BRAF-plasmid, som beskrevet i Tabel 11. Der blev testet tre til seks bestemmelser af hvert panelmedlem ved hjælp af **cobas** BRAF-testen.

Tabel 11
BRAF-homologe plasmidprøver

Panel		Sammensætning efter volumen	
Navn	Medlem	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	- - -
Kontrol	1	95 % vildtype-BRAF	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % vildtype-BRAF	- - -
	3	95 % DNA-elueringsbuffer	5 % BRAF V600E-mutant

Ingen af de tre BRAF-homologe plasmider, der blev testet, blev detekteret af **cobas** BRAF-testen, da de blev testet alene, hvilket indikerer, at BRAF-homologe plasmider ikke krydsreagerer med testen.

Det BRAF V600E-mutante plasmid ved 5 % i tilstedeværelsen af 95 % af de BRAF-homologe plasmider gav i alle tilfælde de forventede resultater "Mutation Detected", hvilket indikerede, at der ikke var nogen interferens fra de homologe plasmider ved detektering af BRAF V600E-mutationen.

Hudrelaterede mikroorganismer

Følgende hudrelaterede mikroorganismer blev fundet ikke at krydsreagere i **cobas** BRAF-testen, når de blev tilføjet en vildtype melanom FFPET-prøve ved 1×10^6 kolonidannende enheder (CFU) under vævslysetrinnet:

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

De testede mikroorganismer udviste heller ikke interferens med detektionen af en FFPET-prøve med 8 % BRAF V600E-mutation ved tilsætning af 1×10^6 kolonidannende enheder (CFU) under vævslysetrinnet.

Interferens

Triglycerider (≤ 74 mM, $2 \times$ CLSI anbefalet høj koncentration¹⁷), hæmoglobin (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ CLSI anbefalet høj koncentration¹⁷) og ≤ 95 % nekrotisk væv ikke interfererer med **cobas** BRAF-testen, når det potentielt interfererende stof blev tilføjet lysisstrinnet under prøveforberedelsesproceduren.

Melanin

Effekten af høje koncentrationer af endogene melanin blev evalueret vha. højt pigmenterede FFPET-melanomprøver. Der blev valgt i alt 41 unikke FFPET-melanomtumorvævsprøver på baggrund af pigmenteringsniveau: 33 var højt pigmenterede, 3 var fra afro-amerikanere, og 5 var let pigmenterede. Der blev udtrukket DNA fra vævet, og melaninkoncentrationen blev fastlagt for hver prøve. Der blev testet én bestemmelse af DNA-stock-opløsningen fra hvert af de to snit, der blev udtaget fra hver af de 41 testede prøver. Tre prøver gav invalide resultater. Én prøve producerede resultatet "Mutation Not Detected", men denne prøve blev bedømt til at være under detektionsgrænsen. De 3 prøver med invalide resultater blev brugt til at sammenligne den anbefalede DNA-koncentration for testen samt som to-gange, fire-gange og otte-gange fortynding af det anbefalede DNA-input på 125 ng/PCR. De resulterende fortyndede DNA-prøver (med i alt 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng eller 15,6 ng DNA i 25 μ l) blev testet igen for at fastlægge, om den

tilsvarende melaninreduktion efter fortynding gav mulighed for gyldige resultater. Alle tre prøver gav korrekte resultater efter fortynding 2 gange.

Tabel 12
Oversigt over cobas BRAF-testperformance med pigmenterede FFPET-melanomprøver

Prøve-id	Fortynding	Melaninmængde i prøve/PCR	Resultat
1	Ingen (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	To-gange (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-gange (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Otte-gange (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Ingen (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	To-gange (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-gange (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Otte-gange (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Ingen (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	To-gange (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fire-gange (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Otte-gange (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Resultaterne af testen af 17 vildtypeprøver viste, at alle prøverne blev korrekt mærket med resultatet "Mutation Not Detected" med undtagelse af 2 højt pigmenterede prøver, der gav falsk-positive resultater.

KLINISK PERFORMANCE

Reproducerbarhed

Der blev udført en undersøgelse for at vurdere reproducerbarheden i **cobas** BRAF-testen på tværs af 3 eksterne testlokaliteter (2 operatører pr. lokalitet), 3 reagenslots og 5 ikke på hinanden følgende testdage med et panel med 8 medlemmer med DNA-prøver, som er udledt fra FFPET-snit i malign melanom. Panelet indeholdt både pigmenterede og ikke-pigmenterede prøver samt en bred vifte af procenttumorindhold og procentmutantallele, herunder én prøve ved 5 %-detekteringsgrænsen. Ud af 94 kørsler var 92 (97,9 %) valide. Ud af 1442 testede prøver, gav 2 prøver (0,14 %) invalide resultater. I forbindelse med alle panelmedlemmer med undtagelse af LoD-prøverne, blev den korrekte betegnelse foretaget for 100 % af de gyldige tests, herunder prøvepanelmedlemmer med 20 % mutation og to panelmedlemmer, der var højt pigmenteret. I forbindelse med LoD-panelmedlemmet blev V600E-mutationen detekteret i 90 % (162/180) af prøverne. Der var ingen falsk-positive for nogen af de testede WT-prøver. Ergo var **cobas** BRAF-testen meget reproducerbar i både pigmenterede og ikke-pigmenterede prøver, i prøver med lavt tumorindhold og med lav procentdel af mutantallele og på tværs af testlokaliteter, operatører, reagenslots og testdage. Den analytiske specificitet var 100 %.

Korrelation til referencemetode for prøver i klinisk forsøg – fase III

Udbredelsen af V600E-mutationen i Fase III-kliniske forsøg var 46,5 % baseret på resultater med **cobas** BRAF-testen. Det er overensstemmende med udbredelsen af V600E i melanompatienter som angivet i litteraturen.

For at kunne evaluere performance af **cobas** BRAF-testen ved sammenligning med 2× bidirektional Sanger-sekventering blev 596 konsekutive patienter, der blev screenet for fase III-forsøget med vemurafenib, identificeret, og ud fra disse blev der indsamlet kliniske, demografiske og Sanger-sekventeringsdata. Ud af disse sager var 94 uegnede pga. manglende inklusionskriterier, 4 sager var uden patologivurdering og 2 sager havde ugyldige **cobas** BRAF-testresultater. Af de resterende egnede 496 prøver indeholdt 47 prøver invalide Sanger-sekventeringsresultater, hvilket efterlod 449 vurderbare prøver. Overensstemmelsesanalysen mellem **cobas** BRAF-testresultaterne og Sanger-sekventeringsresultaterne for detektion af V600E-mutationen er vist nedenfor i Tabel 13.

Tabel 13
Oversigt over cobas BRAF-testresultater sammenlignet med Sanger-sekventering

cobas BRAF-test (testmetode)	Sanger-sekventering (referencemetode)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	I alt
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
I alt	222	227	449
Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 216 / 222 = 97,3 \% (94,2 \% , 98,8 \%)$		
Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 192 / 227 = 84,6 \% (79,3 \% , 88,7 \%)$		
Overordnet procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 408 / 449 = 90,9 \% (87,8 \% , 93,2 \%)$		

^a "Mutation Detected" angiver tilstedeværelsen af den mest udbredte BRAF-mutationstype, V600E (1799 T>A), som identificeret af Sanger.

^b "Mutation Not Detected" angiver manglen på den mest udbredte BRAF-mutationstype, V600E, som identificeret af Sanger (dvs. vildtype eller ingen mutation, V600D, V600E2, V600K, V600R og andre mutationer).

Bemærk! Melanomprøver med gyldige parrede resultater fra **cobas** BRAF-testen og Sanger-sekventering.

Bemærk! CI = (Score) konfidensinterval.

Alle 41 prøver, der gav diskordante **cobas** BRAF-test- og Sanger-sekventeringsresultater blev underlagt 454-sekventering (kvantitativ højparallel pyrosekventering) som sekundær referencemetode. Derudover blev 33 samstemmende **cobas** BRAF-test- og Sanger-sekventeringsprøver testet med 454-sekventering. Den anden overensstemmelsesanalyse – efter diskordantudredning – vises i Tabel 14.

Ud af de 6 diskordante prøver, som havde resultatet "Mutation Not Detected" med **cobas** BRAF-testen og et V600E-resultat fra Sanger-sekventering, detekterede 454-sekventering et vildtyperesultat i 5/6 prøver (én prøve havde et invalide 454-resultat).

Ud af de 8/35 diskordante prøver, som havde resultatet "Mutation Detected" med **cobas** BRAF-testen og et WT-resultat ved Sanger-sekventering, detekterede 454-sekventeringen en V600E-mutation i 7/8 prøver (én prøve havde et invalide 454-resultat).

Ud af de 27/35 diskordante prøver, som havde resultatet "Mutation Detected" med **cobas** BRAF-testen og et ikke-V600E-resultat ved Sanger-sekventering, detekterede 454-sekventeringen en V600K-mutation i 24 prøver, en "V600E2" i én prøve, og en V600E i én prøve. I 1 prøve detekterede Sanger en V600D-mutation og 454-sekventering gav et vildtyperesultat.

Krydsreaktivitetem i **cobas** BRAF-testen for V600K var 66 % (25/38).

Overensstemmelsen med 454-sekventering var 100 % for de 33 **cobas** BRAF-test- og Sanger-sekventeringskonkordante V600E- og WT-prøver.

Tabel 14
cobas BRAF-testresultater sammenlignet med Sanger-sekventering efter diskordantudredning ved 454-sekventering

cobas BRAF-test (testmetode)	Efter diskordantudredning med 454-sekventering		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	I alt
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
I alt	225	224	449
Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 224 / 225 = 99,6 \% (97,5 \% , 99,9 \%)$		
Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 197 / 224 = 87,9 \% (83,0 \% , 91,6 \%)$		
Overordnet procentoverensstemmelse (95 % CI)	$100 \% \times 421 / 449 = 93,8 \% (91,1 \% , 95,7 \%)$		

Fordeling af BRAF codon 600-mutationer

Fordelingen af codon 600-mutationer blev fastlagt i de 496 egnede sager på baggrund af en samling af resultater fra Sanger- og 454-sekventering. Ud af disse 496 sager, var 182 sager vildtype, og 314 sager var mutante. Fordelingen af codon 600-mutationer blandt 314 mutationspositive sager er illustreret i Tabel 15. V600K-mutationer blev identificeret i 13,4 % af alle sager med codon 600-mutationer.

Tabel 15
Fordeling af BRAF codon 600-mutationer fra mutationspositiv population som fastlagt af Sanger og/eller 454-sekventering

Aminosyresekvens (Codon 600)	Nukleotidsekvens (1798-1800)	N	% fordeling
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
I alt codon 600-mutanter		314	100
I alt codon 600 vildtype		182	---

Klinisk virkning af ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

cobas BRAF-testen blev brugt som en "companion"-diagnostisk test til valg af patienter til behandling med ZELBORAF®. Den kliniske sikkerhed og virkning af ZELBORAF® blev påvist i NO25026-undersøgelsen (BRIM3), en international, randomiseret, ikke-blindet, kontrolleret, multicenter, fase III-undersøgelse for tidligere ubehandlede patienter med ikke-resektabelt stadie IIIC- eller stadie IV-melanomer med en V600E BRAF-mutation for at evaluere den kliniske virkning af ZELBORAF® i forhold til dacarbazin (standardplejebehandling). FFPET-prøver fra alle melanompatienter, der blev overvejet til behandling, blev testet med **cobas** BRAF-testen. Patienter med testresultatet "Mutation Detected" var egnede til deltagelse i lægemiddelforsøget, hvis de levede op til andre udvælgelseskriterier. Patienter med testresultatet "Mutation Not Detected" var uegnede til deltagelse i lægemiddelforsøget. Undersøgelsen blev udført ca. 104 steder globalt (22 centre i USA).

Der deltog 675 patienter i forsøget. 337 blev tildelt modtagelse af vemurafenib, og 338 tildelt modtagelse af dacarbazin. Den vigtigste måling af virkningsresultatet for forsøget var overordnet overlevelse (OS) og investigator-vurderet progressionsfri overlevelse (PFS). Andre resultatmålinger inkluderede den bekræftede investigator-vurderede bedste overordnede responsrate.

Baseline-egenskaberne blev afstemt mellem behandlingsgrupperne. De fleste patienter var mænd (56 %) og kaukasiske (99 %), median-alderen var 54 år (24 % var ≥ 65 år), alle patienter havde en ECOG-performancestatus på 0 eller 1, og størstedelen af patienterne havde en metastatisk sygdom (95 %).

Virkningsresultaterne fra forsøget er vist i Tabel 16 og Figur 2:

Tabel 16
Virkning af Vemurafenib til behandlingsnaive patienter med BRAF V600E-mutationspositive melanomer^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dacarbazin (N = 338)	p-værdi ^d
Overordnet overlevelse			
Antal dødsfald	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Risikoforhold (95 % CI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Medianoverlevelse (måneder) (95 % CI) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Median-opfølgning (måneder) (interval)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Risikoforhold for progressionsfri overlevelse (PFS) (95 % CI) ^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 detekteret af **cobas** BRAF-testen

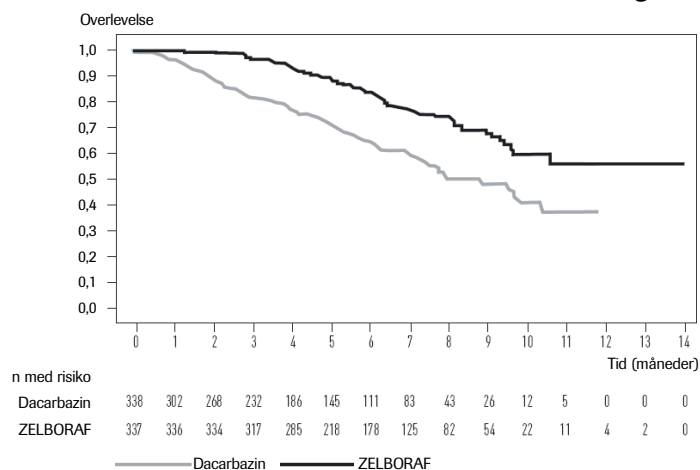
^b Risikoforhold estimeret ved hjælp af Cox-model. Et risikoforhold på < 1 til fordel for vemurafenib

^c Kaplan-Meier-estimat

^d Ustratificeret logrank-test

^e Ikke nået

Figur 2
Kaplan-Meier-kurver for overordnet overlevelse – behandlingsnaive patienter



Den bekræftede investigator-vurderede bedste overordnede responsrate var 48,4 % (95 % CI: 41,6 %, 55,2 %) i ZELBORAF®-delen sammenlignet med 5,5 % (95 % CI: 2,8 %, 9,3 %) i dacarbazin-delen.

Klinisk virkning af COTELLIC® (cobimetinib)^{10, 11}

COTELLIC®, en MEK-hæmmer, blev testet i et klinisk forsøg (coBRIM) i kombination med ZELBORAF® sammenlignet med ZELBORAF® plus placebo. **cobas** BRAF-testen blev brugt til at bestemme egnetheden til deltagelse for patienter i dette kliniske forsøg. Sikkerheden og virkningen af kombinationen af COTELLIC® og ZELBORAF® blev fastlagt i et multicenter, randomiseret (1:1), dobbelt-blindet, placebo-kontrolleret forsøg foretaget på 495 patienter med tidligere ubehandlede, BRAF V600-mutationspositive, ikke-resektable eller metastatiske melanomer. Den vigtigste måling af virkningsresultatet var investigator-vurderet progressionsfri overlevelse (PFS) iht. RECIST v1.1. Yderligere virkningsresultater var den investigator-vurderede, bekræftede, objektive responsrate (ORR), overordnede overlevelse (OS), PFS som vurderet af BICR (Blinded Independent Central Review) og responsvarigheden (DOR).

Baseline-egenskaberne blev afstemt mellem behandlingsgrupperne. De fleste patienter var mænd (58 %) og kaukasiske (93 %), median-alderen var 55 år, 72 % af patienterne havde en ECOG-performancestatus på 0, og 60 % af patienterne havde en fase-M1c-sygdom.

FFPET-prøver fra alle patienter, der blev overvejet til behandling, blev testet med **cobas** BRAF-testen. Patienter med testresultatet "Mutation Detected" var egnede til deltagelse i forsøget, hvis de levede op til andre udvælgelseskriterier. Patienter med resultatet "No Mutation Detected" var uegnede til deltagelse i forsøget. Forsøget inkluderede patienter med BRAF V600K-mutationer som detekteret af **cobas** BRAF-testen med påvisning af behandlingsmæssig produktsikkerhed og virkning i den detekterede del af patientpopulationen med tumorer indeholdende V600K.

Virkningsresultaterne fra forsøget er vist i Tabel 17 og Figur 3:

Tabel 17

Virkning af Cobimetinib i kombination med Vemurafenib til patienter med BRAF-mutationspositive melanomer^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Placebo + Vemurafenib (N = 248)	p-værdi
Progressionsfri overlevelse (investigator-vurderet)			
Antal hændelser (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progression	131	169	
Dødsfald	12	11	
Median-PFS (måneder) (95 % CI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Risikoforhold (95 % CI) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Overordnet overlevelse			
Antal dødsfald (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Medianoverlevelse (måneder) (95 % CI) ^c	Ikke estimerbar (20,7, ikke estimerbar)	17,0 (15,0, ikke estimerbar)	-
Risikoforhold (95 % CI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektiv responsrate (ORR)			
Objektiv responsrate (95 % CI) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Fuldstændig respons	16 %	10 %	
Delvis respons	54 %	40 %	
Median for responsvarighed, måneder (95 % CI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a Som detekteret af **cobas** BRAF-testen

^b Risikoforhold estimeret ved hjælp af Cox-model. Et risikoforhold på < 1 til fordel for cobimetinib + vemurafenib

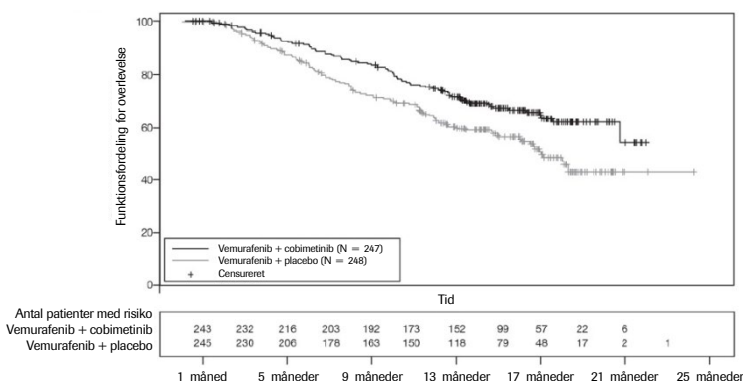
^c Kaplan-Meier-estimat

^d Stratificeret logrank-test

^e Statistisk betydning afhængigt af sammenligningen med den tildelte alfa på 0,019 for denne foreløbige analyse

Figur 3

Kaplan-Meier-kurver for overordnet overlevelse



Tilgængelige tumorprøver fra randomiserede patienter blev analyseret retrospektivt med next generation-sekventering (NGS) for yderligere at klassificere BRAF-mutationer som V600E eller V600K. Testresultaterne blev opnået for 81 % af de randomiserede patienter (400/495). Blandt disse patienter, hvor NGS blev korrekt udført, havde 56 ud af 400 (14 %) patienter tumorer med BRAF V600K-mutationer, og de resterende patienter havde tumorer med BRAF V600E-mutationer. De 56 tumorer, der retrospektivt blev fundet at have BRAF V600K-mutation, havde mutationsfrekvenser på mellem 5,1 og 36,6 % i den pågældende analyse. En tendens til fordel for delen med cobimetinib med vemurafenib blev observeret i eksplorative undergruppeanalyser af PFS, OS og ORR for BRAF V600-mutationsundertyper for de 81 % af patienterne i dette forsøg, hvor BRAF V600-mutationstypen blev påvist.

II. PAPILLÆRT THYREOIDEAKARCINOM (PTC)

EVALUERING AF IKKE-KLINISK PERFORMANCE

I forbindelse med de ikke-kliniske studier, der er beskrevet nedenfor, blev tumoregenskaber, f.eks. % tumorindhold, vurderet af et patologivurderingspanel. Bidirektional Sanger-sekventering blev benyttet til udvælgelse af prøver til test. Det procentvise mutationsniveau blev fastslået vha. 454-sekventering (kvantitativ højparallel pyrosekventeringsmetode).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet – Detektionsgrænse (LoD)

En minimummængde af DNA-input, der producerer 95 % korrekte resultater, blev vurderet vha. fortyndingspaneler, der blev forberedt fra to typer prøver:

- Prøveblandinger, der er forberedt ved at blande DNA-stock-opløsninger, som er indsamlet fra BRAF V600E-mutante FFPET-prøver og FFPET-prøver af vildtype-BRAF for at opnå bestemte mutationsniveauer.
- Individuelle FFPET-DNA-stock-opløsninger, der er forberedt fra to BRAF V600E-mutante FFPET-prøver.

Alle prøver, der er anvendt i dette forsøg, er sekventeret ved hjælp af 454-sekventering for at kunne fastslå procenten af mutation i hver prøve.

Analytisk sensitivitet ved brug af prøveblandinger

BRAF V600E-mutant FFPET-prøve med DNA-stock-opløsninger blev blandet med vildtype-BRAF FFPET-prøve med DNA-stock-opløsninger for at opnå én prøve ved mutationsniveauet ~10 %, én prøve ved ~5 % og én prøve ved ~2 %. Efter blanding blev mutationsniveauerne verificeret ved 454-sekventering. Hver af de tre prøveblandinger med V600E-mutation blev herefter fortyndet med henblik på at producere panelmedlemmerne som angivet i Tabel 18.

Tabel 18
Forberedelse af fortyndingspanelmedlemmer fra prøveblandinger

Blanding	Gennemsnitlig % mutation*	Mængde DNA i fortyndingspanelmedlemmer (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 vildtype)	- - -	125

* Gennemsnitlig procent mutation af blandingen testet med 454-sekventering.

** Mængde genomisk DNA indeholdt i hvert panelmedlem. 25 µl er prøveinputvolumenen for testen.

Otte (8) bestemmelser af hvert panelmedlem blev kørt ved hjælp af hvert af de 3 **cobas** BRAF-testkitlot (n = 24/panelmedlem). Tabel 19 viser sensitiviteten for hver FFPET-prøve, der blev fastlagt ved den laveste mængde DNA, der gav et BRAF V600E-niveau for "Mutation Detected" på mindst 95 % (grå rækker).

Tabel 19
Sensitivitet ved cobas BRAF-test ved brug af FFPET-blandinger

FFPET-blanding	Procent mutation ved 454-sekventering	Mængde DNA i panelmedlem	Niveau af "Mutation Detected" (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 % (vildtype)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Dette forsøg viser, at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutationen ved et mutationsniveau på ≥ 5 % mutation ved hjælp af standardinput på 125 ng/25 µl. Testens evne til at detektere mutation ved lavere DNA-inputniveauer viser, at prøverne kan indeholde nedbrudt DNA fra fikseringsprocessen, og mutationen kan stadig detekteres. Alle testresultater for vildtype-BRAF-prøven var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet ved brug af FFPET-prøver

For at bekræfte 5 %-mutationsdetektion i patientprøver blev fireogtyve individuelle snit på 5 µm fra hver af de to mutante BRAF V600E FFPET-prøver indeholdende mutationsniveauer på hhv. 6 % og 11 % individuelt behandlet ved hjælp af 3 lot af **cobas**® DNA Sample Preparation Kit for at isolere DNA'et. Serielle fortyndinger af DNA fra hvert snit blev forberedt for at producere et sæt på 8 panelmedlemmer som angivet i Tabel 20.

Tabel 20
Forberedelse af fortyndingspanelmedlemmer fra FFPET-prøver

	Gennemsnitlig % V600E-mutation*	Mængde DNA i fortyndingspanelmedlemmer (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

* Gennemsnitlig procent mutation af prøven fastslået ved 454-sekventering

Otte (8) bestemmelser af hvert panelmedlem blev kørt ved hjælp af hvert af de 3 **cobas** BRAF-testkitlot (n = 24/panelmedlem). Sensitiviteten for hver FFPET-prøve blev fastlagt ved den laveste mængde DNA, der gav et BRAF V600E-niveau for "Mutation Detected" på mindst 95 % (grå rækker). Resultaterne af undersøgelsen er vist i Tabel 21.

Tabel 21
Sensitivitet ved cobas BRAF-test ved brug af FFPET-prøver

FFPET-prøve	Procent mutation ved 454-sekventering	Mængde DNA i panelmedlem	Niveau af "Mutation Detected" (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 %

Dette forsøg viser, at **cobas** BRAF-testen kan detektere BRAF V600E-mutationen i aktuelle FFPET-prøver ved et mutationsniveau på ≥ 5 % mutation ved hjælp af standardinput på 125 ng/25 µl. Testens evne til at detektere mutation ved lavere DNA-inputniveauer viser, at prøverne kan indeholde nedbrudt DNA fra fikseringsprocessen, og mutationen kan stadig detekteres.

Repeterbarhed

Der blev udført en undersøgelse for at vurdere repeterbarheden i **cobas** BRAF-testen på tværs af to reagenslot, to brugere og fire testdage med fem papillær thyreoideacancer-FFPET-prøver. Disse FFPET-prøver indeholdt en bred vifte af procenttumorindhold (50 til 70 %) og procentmutant-allele (16 til 22 %), herunder to V600E-mutante prøver ved ~16-18 % mutation ($\sim 3 \times \text{LoD}$). Den korrekte resultatnøjagtighed blev opnået for 100 % af de testede prøver (80/80). Der var ingen falsk-positive for nogen af de testede WT-prøver. Således var **cobas** BRAF-testen meget repeterbar ved prøver med lavt tumorindhold og med lav procentdel af mutant-allele, på tværs af brugere, reagenslot og testdage.

Korrelation til referencemetode

For at kunne evaluere performance af **cobas** BRAF-testen ved sammenligning med 2× bidirektional Sanger-sekventering blev der indsamlet Sanger-sekventeringsdata for 159 PTC-FFPET-prøver. Den primære overensstemmelsesanalyse mellem **cobas** BRAF-testresultaterne og Sanger-sekventeringsresultaterne til detektion af V600E-mutationen er vist i Tabel 22 for et af de to testede reagenslot. Det andet lot gav lignende resultater, bortset fra én prøve, der gav resultatet "Mutation Not Detected". 454-sekventering påviste, at prøven indeholdt 1,4 % mutation og var under den angivne 5 % sensitivitet for **cobas** BRAF-testen.

Tabel 22
Oversigt over cobas BRAF-testresultater sammenlignet med Sanger-sekventering

cobas BRAF-test (testmetode)	Sanger-sekventering (referencemetode)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	I alt
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
I alt	89	70	159
Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 88 / 89 = 98,9 % (93,9 %, 99,8 %)		
Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 57 / 70 = 81,4 % (70,8 %, 88,8 %)		
Overordnet procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 145 / 159 = 91,2 % (85,8 %, 94,7 %)		

^a "Mutation Detected" angiver tilstedeværelsen af den mest udbredte BRAF-mutationstype, V600E (1799 T>A), som identificeret af Sanger.

^b "Mutation Not Detected" angiver manglen på den mest udbredte BRAF-mutationstype, V600E, som identificeret af Sanger (dvs. vildtype eller ingen mutation og andre mutationer).

Bemærk! CI = (Score) konfidensinterval.

Alle prøver, der gav diskordante **cobas** BRAF-test- og Sanger-sekventeringsresultater blev underlagt 454-sekventering (kvantitativ højparallel pyrosekventering) som sekundær referencemetode. Den anden overensstemmelsesanalyse – efter diskordantudredning – vises i Tabel 23.

Én afvigende prøve gav resultatet "Mutation Not Detected" med **cobas** BRAF-testen og et V600E-resultat med Sanger-sekventering. 454-sekventering gav et vildtyperesultat, der var i overensstemmelse med **cobas** BRAF-testen.

For tolv af de tretten diskordante prøver, som fik detekteret en mutation med **cobas** BRAF-testen og en vildtype med Sanger-sekventering, gav 454-sekventering en V600E-mutation (1,2 % til 19 % mutant-allel-frekvens), der var i overensstemmelse med **cobas** BRAF-testen.

Den tilbageværende diskordante prøve, som fik detekteret en V600E-mutation med **cobas** BRAF-testen, var vildtype med Sanger-sekventering og var også vildtype med 454-sekventering. En ekstra 454-sekventeringsundersøgelse bekræftede senere, at prøven var V600E-mutant med en lav procent.

Tabel 23
cobas BRAF-testresultater sammenlignet med Sanger-sekventering efter diskordantudredning ved 454-sekventering

cobas BRAF-test (testmetode)	Sanger-sekventering efter diskordantudredning med 454-sekventering		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	I alt
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
I alt	101	58	159
Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 101 / 101 = 100,0 % (96,3 %, 100,0 %)		
Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 57 / 58 = 98,3 % (90,9 %, 99,7 %)		
Overordnet procentoverensstemmelse (95 % CI)	100 % × 158 / 159 = 99,4 % (96,5 %, 99,9 %)		

LISTE OVER RESULTATMARKERINGER

Resultatflagene kan findes under fanen Results. Kilden til et flag er angivet i flagkoden som beskrevet i den følgende Tabel 24. Tabel 25 viser alle de flag for fortolkning af resultater, der er relevante for brugeren.

Tabel 24
Flagkilde

Flagkode starter med	Flagkilde	Eksempel
M*	Flere eller andre årsager	M6
R	Fortolkning af resultater	R200
Z*	Analyseinstrument	Z1

* Se brugermanualen til **cobas**[®] 4800-systemet eller brugerassistenten til **cobas**[®] 4800-systemet

Tabel 25
Liste over flag for fortolkning af resultater

Flagkode	Alvor	Beskrivelse	Anbefalet handling
R200	Fejl	Mutantkontrol invalid.	Gentag kørslen. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, enten at: 1. En observeret værdi for bøjningskurve for mutantkontrollen lå under den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for lav). Det kan forekomme i tilfælde af en DNA-kontaminering eller en algoritmefejl på grund af et atypisk fluorescensmønster 2. En observeret Ct-værdi for mutantkontrollen lå over den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for høj). Dette kan forekomme i tilfælde af 1) forkert forberedelse af arbejds-Master Mix'et 2) pipetteringsfejl ved tilsætning af arbejds-Master Mix i en reaktionsbrønd på microwell-pladen eller 3) pipetteringsfejl ved tilsætning af mutantkontrol i en brønd på microwell-pladen.
R201	Fejl	Vildtypekontrol ugyldig.	Gentag kørslen. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, enten at: 1. En observeret værdi for bøjningskurve for vildtypekontrollen lå under den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for lav). Det kan forekomme i tilfælde af en DNA-kontaminering eller en algoritmefejl på grund af et atypisk fluorescensmønster 2. En observeret Ct-værdi for vildtypekontrollen lå over den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for høj). Dette kan forekomme i tilfælde af 1) forkert forberedelse af arbejds-Master Mix'et 2) pipetteringsfejl ved tilsætning af arbejds-Master Mix i en reaktionsbrønd på microwell-pladen eller 3) pipetteringsfejl ved tilsætning af vildtypekontrol i en brønd på microwell-pladen.
R202	Fejl	Mutant-Ct. ikke detekteret.	Gentag prøven. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, at der blev ikke observeret en værdi for mutantbøjningskurve for prøven. Dette kan angive fraværet af mutationen i prøven eller kunne angive et af følgende: 1. Lav procentdel af mutantsekvenser, der er under testens detektionsgrænse. 2. Genomisk DNA af dårlig kvalitet fra prøven 3. Utilstrækkelig prøvebehandling 4. Forekomst af PCR-hæmmere i prøven 5. Sjældne mutationer inden for områderne i det genomiske DNA er dækket af primerne og/eller mutantprobe. 6. Pipetteringsfejl ved prøve eller prøve-DNA er muligvis ikke blevet tilsat reaktionsbrønden.

Flagkode	Alvor	Beskrivelse	Anbefalet handling
R203	Fejl	Vildtype-Ct blev ikke detekteret.	Gentag prøven. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, at der blev ikke observeret en værdi for vildtypebøjningskurve for prøven. Fraværet af en værdi for vildtypebøjningskurve er tegn på et eller flere af følgende: 1. Genomisk DNA af dårlig kvalitet fra prøven 2. Utilstrækkelig prøvebehandling 3. Forekomst af PCR-hæmmere i prøven 4. Sjældne mutationer inden for områderne i det genomiske DNA er dækket af primerne og/eller vildtypeprobe. 5. Prøve-DNA'et er muligvis ikke tilsat i en eller flere brønde.
R204	Fejl	Mutant-Ct uden for område.	Gentag prøven. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, enten at: 1. En observeret værdi for bøjningskurve for mutant for prøven var under den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for lav). Dette kan forekomme, hvis PCR blandingen er markant overbelastet med koncentreret genomisk DNA eller på grund af en algoritmefejl, der skyldes fluorescensmønster 2. En observeret værdi for bøjningskurve for mutant for prøven var over den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for høj). Dette kunne være tegn på et eller flere af følgende: • Lav procentdel af mutantsekvenser, der er under testens detektionsgrænse. • Pipetteringsfejl ved tilsætning af prøve-DNA til reaktionsbrønd. • Genomisk DNA af dårlig kvalitet fra prøven • Utilstrækkelig prøvebehandling • Forekomst af PCR-hæmmere i prøven • Sjældne mutationer inden for områderne i det genomiske DNA er dækket af primerne og/eller mutantprobe.
R205	Fejl	Vildtype-Ct uden for område.	Gentag prøven. Se det testspecifikke produktpakningsindlæg. Denne flagkode angiver, enten at: 1. En observeret værdi for bøjningskurve for vildtype for prøven var under den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for lav). Dette kan forekomme, hvis PCR blandingen er markant overbelastet med koncentreret genomisk DNA eller på grund af en algoritmefejl, der skyldes fluorescensmønster 2. En observeret værdi for bøjningskurve for vildtype for prøven var over den fastlagte tærskel (dvs. at bøjningskurven var for høj). Dette kunne være tegn på et eller flere af følgende: • Pipetteringsfejl ved tilsætning af prøve-DNA til reaktionsbrønd. • Genomisk DNA af dårlig kvalitet fra prøven • Utilstrækkelig prøvebehandling • Forekomst af PCR-hæmmere i prøven • Sjældne mutationer inden for områderne i det genomiske DNA er dækket af primerne og/eller vildtypeprobe.

REFERENCER

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

Oplysninger om dokumentrevision	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Opdateret afsnittene TILSIGTET BRUG og OVERSIGT OVER OG FORKLARING AF TESTEN. Tilføjet afsnittene Klinisk effektivitet af ZELBORAF® (vemurafenib) og Klinisk effektivitet af COTELLIC® (cobimetinib). Tilføjet oplysninger om objektglasholdbarhed i afsnittet UDTAGNING, TRANSPORT OG OPBEVARING AF PRØVER. Tilføjet erklæring om melanin i afsnittet BEGRÆNSNINGER VED PROCEDURERNE. Tilføjet generelle sprogopdateringer for tydeliggørelse og overensstemmelse med cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test US-IVD IFU. Kontakt den lokale Roche-repræsentant ved eventuelle spørgsmål.
11/2019	Rettet tekst "FFFPET" til "FFPET" og symbolet for "større end eller lig" på side 24 til korrekt PDF-gengivelse. Siden med harmoniserede symboler er opdateret. Kontakt den lokale Roche-repræsentant ved eventuelle spørgsmål.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Fjernet følgende kitoplysninger angående DNA-prøveforberedelse: • Liste med reagenser og oplysninger om sammensætning • Relaterede proceduretrin og -bemærkninger Tilføjet reference til brugsanvisningen til cobas® DNA Sample Preparation Kit i starten og i afsnittet om begrænsninger ved procedurerne. Opdateret til system- og brugermanualen generelt til "brugermanualen til cobas® 4800-systemet eller brugerassistancen til cobas® 4800-systemet". Foretaget rettelser af tastefejl og opdatering for opnåelse af en konsekvent og standardiseret sprogbrug generelt og for at få ensartethed i forhold til US IFU. Tilføjet resultatflag. Opdateret International Air Transport Association-reference. Opdateret siden med harmoniserede symboler, afsnittet om varemærker og patenter og distributøradresser. Erklæring om, at produktsikkerhedsmærkningen følger EU GHS-retningslinjerne, er tilføjet. Kontakt den lokale Roche-repræsentant ved eventuelle spørgsmål.

Produceret 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

Varemærker og patenter

COBAS, COBAS Z og AMPERASE er varemærker, der tilhører Roche.

Alle øvrige produktnavne og varemærker tilhører deres respektive ejere.

Teknikken til forebyggelse af afsmitning i AmpErase-enzymet er omfattet af U.S. Patent nr. 7,687,247, der tilhører Life Technologies og er licenseret 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 anvendes ved Roche PCR-diagnostiske produkter.



Hjælpesoftware



Lotnummer



Autoriseret repræsentant i EF



Biologisk fare



Barkodedataark



Katalognummer



Se brugsanvisning



Kun til evaluering af IVD-performance



Indeholder tilstrækkeligt til $<n>$ tests



Nedre grænse for tildelt interval



Indhold i pakning



Producent



Distribueret af



Opbevares mørkt



Medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik



Temperaturbegrænsning



Testdefinitionsfil



Sidste anvendelsesdato



Øvre grænse for tildelt interval

Rx Only

Kun USA: Ifølge amerikansk lovgivning må denne enhed kun sælges af eller efter anmodning fra en læge.



Global Trade Item Number



Fremstillingsdato



CE-overensstemmelsesmærkning: Dette udstyr lever op til de gældende krav til CE-mærkning af medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik.

Teknisk kundesupport i USA 1-800-526-1247