



Rx Only

# cobas<sup>®</sup> PIK3CA Mutation Test

Per uso diagnostico *in vitro*



**cobas<sup>®</sup> PIK3CA Mutation Test**

24 Tests

P/N: 07003986190

Campioni FFPET: fare riferimento al **cobas<sup>®</sup>** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) per la preparazione dei campioni.

## INDICE GENERALE

### Uso previsto

#### Riassunto e spiegazione del test

Premessa .....	4
Principi della procedura .....	5
Sequenze di riferimento .....	5
Preparazione dei campioni .....	6
Amplificazione PCR.....	6
Selezione del target.....	6
Amplificazione del target .....	6
Rilevazione real-time automatizzata della mutazione .....	6
Amplificazione selettiva .....	7

#### Reagenti e materiali

Reagenti forniti per cobas® PIK3CA Mutation Test, 24 test (P/N: 07003986190).....	7
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	8
Materiali aggiuntivi necessari .....	8
Strumentazione e software necessari ma non forniti .....	8

#### Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni.....	9
Buone pratiche di laboratorio.....	9
Contaminazione .....	9
Integrità .....	10
Smaltimento .....	10
Fuoriuscite e pulizia .....	10
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni .....	10
Prelievo dei campioni .....	10
Trasporto, conservazione e stabilità dei campioni .....	10
Conservazione e stabilità dei campioni trattati.....	11

#### Procedura del test

Esecuzione del test.....	11
Istruzioni per l'uso.....	12
Controllo dell'intero processo .....	12
Amplificazione e rilevazione.....	13
Preparazione della reazione .....	15
Preparazione della piastra .....	16
Avvio della PCR.....	17

**Risultati**

Interpretazione dei risultati .....	18
Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi.....	18
Controllo di qualità e validità dei risultati .....	19
Controllo mutante.....	19
Controllo negativo .....	19
Limiti della procedura .....	19

**Valutazione delle prestazioni non cliniche**

Caratteristiche delle prestazioni .....	20
Sensibilità analitica e limite del bianco (LoB) .....	20
Limite di sensibilità con le miscele di campioni FFPET .....	20
Rilevazione dei genotipi rari con i plasmidi .....	22
Ripetibilità .....	22
Correlazione con un metodo di riferimento .....	22
Reattività crociata.....	25
Valutazione delle potenziali sostanze interferenti.....	26

**Valutazione delle prestazioni cliniche**

Studio di riproducibilità clinica.....	27
--	----

**Flag dei risultati**

Spiegazione dei flag dei risultati .....	28
--	----

**Informazioni supplementari**

Caratteristiche specifiche del test .....	30
Simboli .....	31
Assistenza tecnica .....	32
Fabbricante.....	32
Marchi e brevetti.....	32
Copyright.....	32
Bibliografia .....	33
Revisione del documento .....	34

## Uso previsto

Il **cobas**® PIK3CA Mutation Test è un test Real-time PCR che consente la rilevazione qualitativa e l'identificazione di 17 mutazioni negli esoni 2, 5, 8, 10 e 21 del gene che codifica per la subunità catalitica della fosfoinositide 3-chinasi (PIK3CA) nei campioni di DNA estratti da tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPET). Il **cobas**® PIK3CA Mutation Test è un test Real-time PCR da utilizzare sul **cobas**® 4800 System per identificare le pazienti con carcinoma mammario metastatico in cui sono presenti queste mutazioni genetiche.

## Riassunto e spiegazione del test

### Premessa

La via di segnalazione della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) è un regolatore chiave di molti meccanismi cellulari normali, come la crescita, la sopravvivenza, la motilità e proliferazione delle cellule.<sup>1-3</sup> L'attivazione e la disregolazione della via PI3K sono implicate in molti tipi di carcinomi umani.<sup>4</sup> Nel cancro, un importante meccanismo di attivazione della via avviene tramite dei recettori denominati recettori tirosin chinasi (*Receptor Tyrosine Kinase*: RTK), ad esempio il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*: HER-2) o il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (*Epidermal Growth Factor Receptor*: EGFR). PI3K, Akt e mTOR sono 3 importanti snodi nella via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR.<sup>5</sup> In seguito all'attivazione della PI3K, il fosfatidilinositolo (4,5)-bisfosfato (PIP2) si converte in fosfatidilinositolo (3,4,5)-trisfosfato (PIP3), che è un importante secondo messaggero capace di stimolare un'ampia gamma di effettori a valle, tra cui Akt e mTOR. L'attivazione della via PI3K/Akt/mTOR dà origine a moltissimi processi cellulari, tra cui la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule.<sup>6</sup>

Il PIK3CA è uno degli oncogeni con il più alto numero di mutazioni identificate nei carcinomi umani. Per di più molte delle mutazioni identificate interessano un piccolo numero di hotspot nella proteina (i codoni 1047 [40%], 545 [25%] e 542 [13%]).<sup>7</sup> La maggior parte delle mutazioni è presente principalmente negli esoni 10 e 21 del gene PIK3CA, sebbene siano state trovate mutazioni attivanti anche negli esoni 2, 5 e 8. Come mostra il database COSMIC, il gene PIK3CA risulta mutato il 12% delle volte in tutti i diversi tipi di cancro. Per quanto riguarda il tumore del seno (*Breast Cancer*: BC), le mutazioni del gene PIK3CA sono state identificate nel 26% dei tumori analizzati. Le mutazioni del gene PIK3CA sono più comuni nel BC positivo ai recettori ormonali (circa il 40%) e nel BC positivo a HER-2 (circa il 25%).<sup>8,9</sup>

Nelle donne, il tumore del seno è il tipo di carcinoma più frequente ed è anche la principale causa di morte per cancro. Nel 2017 il tumore del seno ha rappresentato il 25% dei casi di carcinoma totali e ha causato il 15% delle morti per cancro tra le donne in tutto il mondo.<sup>10</sup> Secondo una stima, la metà circa dei casi di BC e il 60% dei decessi correlati avvengono nei paesi economicamente sviluppati. In generale, i tassi di incidenza sono alti in Europa occidentale e settentrionale, in Australia/Nuova Zelanda e in America settentrionale. I fattori che concorrono alla variazione internazionale dei tassi di incidenza dipendono essenzialmente dalle differenze esistenti nei fattori riproduttivi e ormonali e dalla disponibilità dei servizi di diagnosi precoce.<sup>11</sup> Vi è la necessità di trovare nuove terapie per abbattere l'elevata incidenza del tumore del seno in generale, oltre che l'elevato numero di morti per cancro causate dal BC. Conoscere lo stato mutazionale del gene PIK3CA è importante per poter sfruttare terapie mirate all'attività della via PIK3CA.

Le mutazioni rilevate dal **cobas**® PIK3CA Mutation Test (abbreviato in test **cobas** PIK3CA) sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Mutazioni rilevate dal test cobas® PIK3CA

Numero dell'esone PIK3CA corrente	Numero dell'esone PIK3CA precedente*	Mutazione PIK3CA	Sequenza di acido nucleico PIK3CA	Nomenclatura delle proteine dell'HGVS**	Nomenclatura dei nucleotidi dell'HGVS**	ID COSMIC <sup>12</sup>
2	1	R88Q	263G>A	NM_006218.2:p.(Arg88Gln)	NM_006218.2:c.263G>A	746
5	4	N345K	1035T>A	NM_006218.2:p.(Asn345Lys)	NM_006218.2:c.1035T>A	754
8	7	C420R	1258T>C	NM_006218.2:p.(Cys420Arg)	NM_006218.2:c.1258T>C	757
10	9	E542K	1624G>A	NM_006218.2:p.(Glu542Lys)	NM_006218.2:c.1624G>A	760
10	9	E545A	1634A>C	NM_006218.2:p.(Glu545Ala)	NM_006218.2:c.1634A>C	12458
10	9	E545D	1635G>T	NM_006218.2:p.(Glu545Asp)	NM_006218.2:c.1635G>T	765
10	9	E545G	1634A>G	NM_006218.2:p.(Glu545Gly)	NM_006218.2:c.1634A>G	764
10	9	E545K	1633G>A	NM_006218.2:p.(Glu545Lys)	NM_006218.2:c.1633G>A	763
10	9	Q546E	1636C>G	NM_006218.2:p.(Gln546Glu)	NM_006218.2:c.1636C>G	6147
10	9	Q546K	1636C>A	NM_006218.2:p.(Gln546Lys)	NM_006218.2:c.1636C>A	766
10	9	Q546L	1637A>T	NM_006218.2:p.(Glu546Leu)	NM_006218.2:c.1637A>T	25041
10	9	Q546R	1637A>G	NM_006218.2:p.(Gln546Arg)	NM_006218.2:c.1637A>G	12459
21	20	H1047L	3140A>T	NM_006218.2:p.(His1047Leu)	NM_006218.2:c.3140A>T	776
21	20	H1047R	3140A>G	NM_006218.2:p.(His1047Arg)	NM_006218.2:c.3140A>G	775
21	20	H1047Y	3139C>T	NM_006218.2:p.(His1047Tyr)	NM_006218.2:c.3139C>T	774
21	20	G1049R	3145G>C	NM_006218.2:p.(Gly1049Arg)	NM_006218.2:c.3145G>C	12597
21	20	M1043I	3129G>T	NM_006218.2:p.(Met1043Ile)	NM_006218.2:c.3129G>T	773

\* La precedente numerazione dell'esone PIK3CA escludeva il primo esone non tradotto

\*\* HGVS: Human Genome Variation Society

## Principi della procedura

Il test **cobas** PIK3CA si basa su due procedure principali: (1) preparazione manuale dei campioni per estrarre il DNA genomico dal tessuto FFPE; e (2) amplificazione PCR e rilevazione del DNA target tramite coppie di primer complementari e sonde oligonucleotidiche marcate con fluorocromi. Il test è progettato per rilevare le seguenti mutazioni: R88Q nell'esone 2, N345K nell'esone 5, C420R nell'esone 8, E542K, E545X (E545A, E545D\*, E545G e E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L e Q546R) nell'esone 10 e M1043I\*\*, H1047X (H1047L, H1047R e H1047Y) e G1049R nell'esone 21. La mutazione viene rilevata attraverso l'analisi PCR eseguita con il **cobas z 480 analyzer**. Per confermare la validità della seduta, ogni volta vengono inclusi un controllo mutante e un controllo negativo.

\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido E545D, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.1635G>T.

\*\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido M1043I, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.3129G>T.

## Sequenze di riferimento

Per conoscere la sequenza di riferimento per il gene PIK3CA, consultare la seguente fonte.<sup>13</sup>

PIK3CA: LRG\_310t1

## Preparazione dei campioni

Il **cobas**® DNA Sample Preparation Kit, un metodo generico per la preparazione manuale dei campioni basato sulla capacità di legame degli acidi nucleici con le fibre di vetro, viene impiegato per il trattamento dei campioni FFPE e l'estrazione del DNA genomico. Una sezione deparaffinata di un campione FFPE, dello spessore di 5 µm, viene sottoposta a lisi mediante incubazione ad una temperatura elevata, con una proteasi e tampone di lisi/legame caotropico che rilascia gli acidi nucleici e protegge dalle DNasi il DNA genomico rilasciato. La miscela di lisi viene quindi addizionata di isopropanolo e centrifugata attraverso una colonnina con un inserto a filtro in fibra di vetro. Durante la centrifugazione, il DNA genomico si lega alla superficie del filtro in fibra di vetro. Le sostanze che non formano legami, ad esempio i sali, le proteine e altre impurità cellulari, vengono rimosse mediante centrifugazione. Gli acidi nucleici adsorbiti vengono lavati e quindi eluiti con una soluzione acquosa. La quantità di DNA genomico viene determinata tramite spettrofotometro e corretta fino a una concentrazione fissa da aggiungere alla miscela di amplificazione e rilevazione. Il DNA target viene quindi sottoposto ad amplificazione e rilevazione sul **cobas z 480 analyzer** con i reagenti di amplificazione e rilevazione inclusi nel kit del test **cobas PIK3CA**.

## Amplificazione PCR

### Selezione del target

Il kit del test **cobas PIK3CA** utilizza un pool di primer che definiscono specifiche sequenze di coppie di basi (lunghe tra 85 e 155 coppie di basi) negli esoni 2, 5, 8, 10 e 21 del gene PIK3CA. Un'ulteriore coppia di primer ha come target una regione conservata di 167 coppie di basi nell'esone 4 del gene PIK3CA, pertanto consente di controllare il processo dal punto di vista dell'adeguatezza, dell'estrazione e dell'amplificazione cellulare. L'amplificazione avviene esclusivamente nelle regioni del gene PIK3CA comprese tra i primer: non viene amplificato l'intero gene PIK3CA.

### Amplificazione del target

Per l'amplificazione del target viene utilizzato un derivato della DNA polimerasi *Thermus species* Z05-AS1. Inizialmente la miscela della reazione PCR viene riscaldata per consentire la denaturazione del DNA genomico e l'esposizione delle sequenze target dei primer. A mano a mano che la miscela si raffredda, i primer upstream e downstream (a monte e a valle) si appaiano alle sequenze di DNA target. In presenza di ioni di metallo divalenti e di dNTP in eccesso, la DNA polimerasi Z05-AS1 estende ogni primer appaiato e sintetizza così un secondo filamento di DNA. Il primo ciclo di PCR termina quindi con la produzione di una copia di DNA a doppio filamento, che include le regioni delle coppie di basi target del gene PIK3CA. Questo processo viene ripetuto per un certo numero di cicli e, ad ogni ciclo, la quantità di DNA amplicone raddoppia.

### Rilevazione real-time automatizzata della mutazione

Il test **cobas PIK3CA** utilizza la tecnologia Real-time PCR. Nella reazione, ogni sonda oligonucleotidica target-specifica è marcata con un fluorocromo rivelatore (reporter) e con un fluorocromo soppressore (quencher), ovvero una molecola in grado di assorbire (sopprimere) le emissioni fluorescenti del reporter in una sonda intatta. Ad ogni ciclo di amplificazione, la sonda complementare alla sequenza di DNA a filamento singolo nell'amplicone si lega e viene successivamente scissa dall'attività di 5'→3' nucleasi della DNA Polimerasi Z05-AS1. Dopo che il fluorocromo reporter viene separato dal fluorocromo quencher da questa attività di nucleasi, la fluorescenza di una lunghezza d'onda caratteristica può essere misurata quando il fluorocromo reporter viene eccitato da uno spettro di luce appropriato. Vengono utilizzati quattro diversi fluorocromi reporter per rilevare le sequenze di PIK3CA ricercate dal test. Le sequenze target amplificate del gene PIK3CA vengono rilevate in modo indipendente in tre reazioni, attraverso la misurazione della fluorescenza alle quattro lunghezze d'onda caratteristiche nei canali ottici dedicati.

## Amplificazione selettiva

Nel test cobas PIK3CA, l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target estratto dal campione è ottenuta grazie all'uso dell'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) e del trifosfato di deossitimidina (dTTP).<sup>14</sup> L'enzima AmpErase riconosce e catalizza la distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossitimidina, ma non del DNA contenente timidina. La deossitimidina non è presente nel DNA naturale, ma è sempre presente nell'amplicone perché il dTTP viene utilizzato in aggiunta alla deossitimidina trifosfato come uno dei nucleotidi trifosfati contenuti nei reagenti Master Mix, pertanto solo l'amplicone contiene deossitimidina. La deossitimidina fa sì che l'amplicone contaminante sia suscettibile alla distruzione da parte dell'enzima AmpErase prima dell'amplificazione del DNA target. L'enzima AmpErase, che è contenuto nei reagenti Master Mix, catalizza la scissione del DNA contenente deossitimidina al livello dei residui di deossitimidina, aprendo la catena di deossiribosio in posizione C1. Durante il riscaldamento, nella prima fase del ciclo termico a pH alcalino, la catena del DNA amplicone si spezza in corrispondenza della posizione della deossitimidina, rendendo così non amplificabile il DNA. L'enzima AmpErase è inattivo a temperature superiori ai 55°C (quindi durante tutte le fasi del ciclo termico), pertanto non distrugge l'amplicone target.

## Reagenti e materiali

Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati secondo le indicazioni contenute nella tabella Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.

### Reagenti forniti per cobas® PIK3CA Mutation Test, 24 test (P/N: 07003986190)

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento
<b>PIK3CA MMX-1</b> (Soluzione Master Mix PIK3CA 1; tappo con bottone bianco) (P/N: 07003897001)	Tampone Tris, cloruro di potassio, glicerolo, EDTA, tensioattivo non ionico, dimetilsolfossido, 0,09% sodio azide, dNTP, DNA polimerasi, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), Aptamero, primer PIK3CA, sonde fluorescenti PIK3CA	2 × 0,48 ml	N/D
<b>PIK3CA MMX-2</b> (Soluzione Master Mix PIK3CA 2; tappo con bottone dorato) (P/N: 07003927001)	Tampone Tris, cloruro di potassio, glicerolo, EDTA, tensioattivo non ionico, dimetilsolfossido, 0,09% sodio azide, dNTP, DNA polimerasi, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), Aptamero, primer PIK3CA, sonde fluorescenti PIK3CA	2 × 0,48 ml	N/D
<b>PIK3CA MMX-3</b> (Soluzione Master Mix PIK3CA 3; tappo con bottone verde-blu) (P/N: 07003943001)	Tampone Tris, cloruro di potassio, glicerolo, EDTA, tensioattivo non ionico, dimetilsolfossido, 0,09% sodio azide, dNTP, DNA polimerasi, enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), Aptamero, primer PIK3CA, sonde fluorescenti PIK3CA	2 × 0,48 ml	N/D
<b>MGAC</b> (Acetato di magnesio; tappo con bottone giallo) (P/N: 05854326001)	Acetato di magnesio, 0,09% sodio azide	6 × 0,20 ml	N/D
<b>PIK3CA MC</b> (Controllo Mutante PIK3CA; tappo con bottone rosso) (P/N: 07003960001)	Tampone Tris, EDTA, Poly-rA RNA (sintetico), 0,05% sodio azide, DNA plasmidico contenente sequenze dell'esone 2, 5, 8, 10 e 21 di PIK3CA, DNA wild-type di PIK3CA	6 × 0,10 ml	N/D
<b>DNA SD</b> (Diluyente del campione di DNA) (P/N: 05854474001)	Tampone Tris-HCl, 0,09% sodio azide	2 × 3,5 ml	N/D

## Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

Reagente	Temperatura di conservazione	Tempo di conservazione
cobas® PIK3CA Mutation Test*	Tra 2°C e 8°C	Dopo l'apertura, è stabile per 4 utilizzi in 90 giorni o fino alla data di scadenza indicata, se precedente.

\* I reagenti **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** e la soluzione di lavoro MMX (preparata aggiungendo **MGAC** a **PIK3CA MMX-1** o **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3**) devono essere protetti dall'esposizione prolungata alla luce. La soluzione di lavoro MMX deve essere conservata al buio, a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C. Entro 1 ora dalla preparazione della soluzione di lavoro MMX è necessario aggiungere i controlli e i campioni preparati. L'amplificazione deve obbligatoriamente iniziare entro 1 ora dall'aggiunta dei controlli e dei campioni preparati alla soluzione di lavoro Master Mix.

Prima dell'uso, ispezionare visivamente ogni reagente per escludere eventuali perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.

## Materiali aggiuntivi necessari

Materiali	P/N
Ipoclorito di sodio (candeggina)	Qualsiasi fornitore
Etanolo 70%	Qualsiasi fornitore
Micropiastra (piastra per PCR) e pellicola adesiva per cobas® 4800 System	Roche 05232724001
Applicatore pellicola adesiva per cobas® 4800 System (fornito con l'installazione del cobas® 4800 System)	Roche 04900383001
Pipettatori regolabili* (volume di pipettamento da 5 a 1000 µl)	Qualsiasi fornitore
Puntali privi di DNasi con filtro antiaerosol o a spostamento positivo	Qualsiasi fornitore
Microcentrifuga da tavolo* (velocità fino a 20.000 × g)	Qualsiasi fornitore
Provette per microcentrifuga con tappo ermetico (da 1,5 ml, sterili, prive di RNasi/DNasi, grado PCR)	Qualsiasi fornitore
Rack per provette per microcentrifuga	Qualsiasi fornitore
Spettrofotometro per misurare la concentrazione di DNA*	Qualsiasi fornitore
Miscelatore vortex*	Qualsiasi fornitore
Guanti monouso, senza talco	Qualsiasi fornitore

\* La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

## Strumentazione e software necessari ma non forniti

Strumentazione e software necessari, non forniti	P/N
cobas z 480 analyzer e unità di controllo	05200881001
cobas® 4800 System Application Software (Core) versione 2.2 o successiva	07565500001
cobas® PIK3CA P1 Analysis Package Software versione 1.0 o successiva	08249628001

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

# Precauzioni e requisiti per l'uso

## Avvertimenti e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili su richiesta presso la sede Roche locale.
- Questo test è destinato all'uso con campioni FFPE. I campioni devono essere trattati come se fossero infettivi, adottando le procedure di sicurezza del laboratorio descritte nella pubblicazione Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>15</sup> e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>16</sup>
- Si raccomanda di utilizzare pipette sterili monouso e puntali di pipettamento privi di DNasi.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- In caso di incidenti gravi che dovessero verificarsi durante l'uso di questo test, inviare una segnalazione all'autorità competente locale e al produttore.

## Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio.
- Dopo avere manipolato i campioni e i reagenti del kit, lavarsi accuratamente le mani.
- Indossare occhiali protettivi, camici da laboratorio e guanti da laboratorio durante la manipolazione dei reagenti. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscite, diluire con acqua prima di asciugare.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.

*Nota: la candeggina liquida per uso domestico, normalmente reperibile in commercio, contiene ipoclorito di sodio a una concentrazione del 5,25%. La diluizione 1:10 della candeggina per uso domestico consente di ottenere una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%.*

## Contaminazione

- Per evitare contaminazioni è necessario indossare i guanti e sostituirli durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del test **cobas** PIK3CA. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni.
- È necessario sostituire spesso i guanti per ridurre il rischio di contaminazione.
- I guanti devono essere sostituiti prima di allontanarsi dalle aree in cui avviene l'estrazione del DNA o in caso di sospetto contatto con le soluzioni o con un campione.
- Evitare la contaminazione batterica dei reagenti.
- È necessario pulire accuratamente l'area di lavoro dedicata all'amplificazione e alla rilevazione prima di procedere alla preparazione della soluzione di lavoro MMX. È opportuno dedicare i consumabili e le apparecchiature a singole attività e non utilizzarli per altre attività, né spostarli da un'area all'altra. Ad esempio, i pipettatori e i consumabili utilizzati per l'estrazione del DNA non devono essere utilizzati per la preparazione dei reagenti di amplificazione e rilevazione.

È consigliabile approntare un flusso di lavoro unidirezionale nel laboratorio, completando un'attività prima di passare alla successiva. Ad esempio, l'estrazione del DNA deve essere completata prima di avviare l'amplificazione e la rilevazione. Il DNA deve essere estratto in un'area del laboratorio separata fisicamente dall'area in cui avverranno l'amplificazione e la rilevazione. Per evitare di contaminare la soluzione di lavoro Master Mix con i campioni di DNA, è opportuno pulire accuratamente l'area di lavoro in cui avvengono l'amplificazione e la rilevazione prima di iniziare a preparare la soluzione di lavoro Master Mix.

## Integrità

- Non utilizzare i kit dopo le date di scadenza.
- Non mescolare reagenti appartenenti a kit o a lotti diversi.
- Non mescolare i flaconi dei reagenti appartenenti a lotti diversi del kit.
- Non utilizzare i consumabili dopo la data di scadenza.
- Tutti i consumabili sono monouso. Non riutilizzare.
- La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.

## Smaltimento

1. I reagenti **MGAC**, **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3**, **PIK3CA MC** e **DNA SD** contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame, formando azoturi metallici altamente esplosivi. Durante lo smaltimento delle soluzioni contenenti sodio azide nei lavelli del laboratorio, lavare gli scarichi con abbondante acqua fredda per impedire l'accumulo di azoturi.
2. Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto nel rispetto delle leggi vigenti.

## Fuoriuscite e pulizia

- In caso di fuoriuscita di liquido sul **cobas**® 4800 instrument, pulire attenendosi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.
- Non utilizzare la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) per la pulizia del **cobas z 480 analyzer**. Pulire il **cobas z 480 analyzer** attenendosi alle procedure descritte nell'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.
- Per ulteriori avvertenze, precauzioni e procedure volte a ridurre il rischio di contaminazione per il **cobas z 480 analyzer**, consultare l'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.

## Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

*Nota: manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.*

### Prelievo dei campioni

I campioni FFPET di BC sono stati validati per l'uso con il test **cobas** PIK3CA.

### Trasporto, conservazione e stabilità dei campioni

I campioni FFPET di BC possono essere trasportati tra 15°C e 30°C. Il trasporto dei campioni FFPET di BC deve avvenire nel rispetto dei regolamenti locali, regionali e nazionali per il trasporto degli agenti eziologici.<sup>17</sup>

La stabilità dei campioni FFPET di BC conservati tra 15°C e 30°C è confermata fino a 12 mesi dopo la data del prelievo. Le sezioni da 5 µm montate sui vetrini possono essere conservate tra 15°C e 30°C per non più di 60 giorni.

I campioni FFPET di BC sono stabili per:

Tipo di campione FFPET	Blocco FFPET	Sezione FFPET di 5 µm
Temperatura di conservazione dei campioni FFPET	Tra 15°C e 30°C	Tra 15°C e 30°C
Tempo di conservazione	Fino a 12 mesi	Fino a 60 giorni

## Conservazione e stabilità dei campioni trattati

I campioni trattati (DNA estratto) sono stabili per una delle seguenti condizioni:

Temperatura di conservazione del DNA estratto	Tra -15°C e -25°C	Tra 2°C e 8°C	Tra 15°C e 30°C
Tempo di conservazione	Massimo 3 cicli di congelamento/ scongelamento in 60 giorni	Fino a 14 giorni	Fino a 1 giorno

Il DNA estratto deve essere utilizzato entro i periodi di conservazione consigliati o prima della data di scadenza del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizzato, se anteriore.

## Procedura del test

### Esecuzione del test

Figura 1. Flusso di lavoro del test cobas PIK3CA con il cobas® DNA Sample Preparation Kit

N°	Passaggio del flusso di lavoro
1	Avviare il sistema
2	Eeguire la manutenzione dello strumento
3	Prelevare i campioni e i reagenti dal luogo in cui sono conservati
4	Deparaffinare i campioni
5	Isolare il DNA
6	Eluire il DNA
7	Creare il work order e stampare la configurazione della piastra
8	Preparare i reagenti di amplificazione
9	Caricare i reagenti di amplificazione sulla micropiastra
10	Caricare il campione sulla micropiastra
11	Sigillare la micropiastra
12	Caricare la micropiastra sul <b>cobas z</b> 480 analyzer
13	Avviare la seduta
14	Rivedere i risultati
15	Con sistema LIS: inviare i risultati al sistema LIS
16	Scaricare tutto il materiale dall'analizzatore

## Istruzioni per l'uso

**Nota:** con il test **cobas** PIK3CA è necessario utilizzare esclusivamente sezioni FFPE di BC che abbiano uno spessore di 5 µm e almeno il 10% di contenuto tumorale per area. Dopo la deparaffinazione, eseguire la macrodissezione di eventuali campioni con un contenuto tumorale inferiore al 10% per area.

**Nota:** per istruzioni operative dettagliate sul **cobas z 480 analyzer**, fare riferimento all'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.

### Dimensioni della seduta

In una seduta è possibile includere da un minimo di 1 a un massimo di 30 campioni (più i controlli) per ogni micro-piastra con 96 pozzetti. Quando si analizzano più di 24 campioni, è necessario utilizzare un numero multiplo di kit del test **cobas** PIK3CA.

Il test **cobas** PIK3CA contiene una quantità di reagenti sufficiente per 8 sedute di 3 campioni (più i controlli), per un massimo di 24 campioni per kit.

### Controllo dell'intero processo

Questo test richiede un controllo negativo (**NEG**) per l'intero processo. Per ogni seduta, analizzare un **NEG** contemporaneamente al campione (o ai campioni), iniziando dalla procedura di estrazione del DNA.

### Estrazione del DNA

Per estrarre il DNA dai campioni FFPE di BC, utilizzare il **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

### Macrodissezione

Se il campione ha un contenuto tumorale inferiore al 10% della superficie, è necessario preparare il campione eseguendo una macrodissezione.

### Quantificazione del DNA

**Nota:** la concentrazione del DNA deve essere misurata subito dopo la procedura di estrazione del DNA e prima della conservazione.

**Nota:** conservare lo stock di DNA seguendo le istruzioni contenute nella sezione **Trasporto, conservazione e stabilità dei campioni**.

1. Miscelare ogni stock di DNA agitando in vortex per 5 secondi.
2. Quantificare il DNA utilizzando uno spettrofotometro secondo il protocollo del produttore. Utilizzare il tampone di eluizione del DNA (**DNA EB**) come bianco per lo strumento. Servono in media due letture concordanti. La differenza tra le due misurazioni non dovrebbe superare  $\pm 10\%$  quando le letture della concentrazione del DNA sono  $\geq 20,0$  ng/µl. Se le letture della concentrazione del DNA sono  $< 20,0$  ng/µl, la differenza tra le due misurazioni deve essere compresa entro  $\pm 2$  ng/µl. Se la differenza tra le due misurazioni non è compresa entro  $\pm 10\%$ , quando le letture della concentrazione del DNA sono  $\geq 20,0$  ng/µl, oppure non è compresa entro  $\pm 2$  ng/µl, quando le letture della concentrazione del DNA sono  $< 20,0$  ng/µl, è necessario eseguire altre 2 letture finché i requisiti non saranno soddisfatti. A quel punto sarà necessario calcolare la media delle due nuove misurazioni.

**Nota:** non è necessario eseguire la misurazione dello stock di DNA ottenuto dal controllo negativo (**NEG**) trattato.

3. Per poter eseguire il test **cobas** PIK3CA, la concentrazione dello stock di DNA ottenuto dai campioni deve essere  $\geq 2$  ng/ $\mu$ l. Vengono eseguiti tre amplificazioni/rilevazioni per campione, utilizzando 25  $\mu$ l di una diluizione di 2 ng/ $\mu$ l dello stock di DNA (in totale 50 ng di DNA) per ogni amplificazione/rilevazione.

**Nota:** per poter eseguire il test **cobas** PIK3CA, la concentrazione minima di ogni stock di DNA deve essere di 2 ng/ $\mu$ l. Se la concentrazione dello stock di DNA è  $< 2$  ng/ $\mu$ l, per il campione in questione è necessario ripetere le procedure di deparaffinazione, estrazione e quantificazione del DNA utilizzando due sezioni FFPET di 5  $\mu$ m. Per quanto riguarda i campioni montati sui vetrini, dopo la deparaffinazione è necessario unire il tessuto di entrambe le sezioni in un'unica provetta, immergere il tessuto nel tampone di lisi del DNA tissutale (**DNA TLB**) + **Proteinasi K (PK)**, infine eseguire le procedure di estrazione e quantificazione del DNA descritte in precedenza. Per quanto riguarda i campioni non montati sui vetrini, unire le due sezioni in un'unica provetta e deparaffinare. Immergere il tessuto in **DNA TLB + PK** ed eseguire l'estrazione e la quantificazione del DNA seguendo la procedura descritta in precedenza. Se lo stock di DNA è ancora  $< 2$  ng/ $\mu$ l, rivolgersi al laboratorio clinico dal quale proviene il campione per richiedere un altro campione FFPET.

### **Amplificazione e rilevazione**

**Nota:** per evitare che la soluzione di lavoro MMX venga contaminata dai campioni di DNA, la procedura di amplificazione e rilevazione deve essere svolta in un'area diversa dall'area in cui viene estratto il DNA. È necessario pulire accuratamente l'area di lavoro dedicata all'amplificazione e alla rilevazione prima di procedere alla preparazione della soluzione di lavoro MMX. Per una pulizia adeguata di tutte le superfici, inclusi rack e pipettatori, utilizzare prima una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e quindi una soluzione di etanolo al 70%. La candeggina liquida per uso domestico, normalmente reperibile in commercio, contiene ipoclorito di sodio a una concentrazione del 5,25%. La diluizione 1:10 della candeggina per uso domestico consente di ottenere una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%.

### **Configurazione dello strumento**

Per istruzioni dettagliate sulla configurazione del **cobas z 480 analyzer**, consultare l'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.

### **Configurazione degli ordini dei test**

Per istruzioni dettagliate su questi passaggi del flusso di lavoro del test **cobas** PIK3CA, fare riferimento all'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.

Generare una mappa della piastra con le posizioni di tutti i campioni e i controlli inclusi nella seduta. Il controllo mutante (MC) viene caricato nelle posizioni A01-A03 della piastra. Il controllo negativo (**NEG**) viene caricato nelle posizioni B01-B03 della piastra. I campioni diluiti vengono quindi aggiunti in serie di 3 colonne, partendo dalle posizioni C01-C03 fino alle posizioni H10-H12 (Tabella 2).

**Tabella 2. Configurazione della piastra per il test cobas PIK3CA**

Riga/ Colonna	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<b>A</b>	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3
<b>B</b>	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3
<b>C</b>	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3
<b>D</b>	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3
<b>E</b>	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3
<b>F</b>	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3
<b>G</b>	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3
<b>H</b>	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3

Legenda: MC = Controllo Mutante, NEG = Controllo Negativo, S# = ID Campione e MMX-# = Reagente Master Mix 1, 2 o 3.

**Nota:** ogni campione deve essere dispensato su di una riga di tre colonne consecutive per poter generare un risultato.

**Nota:** la soluzione di lavoro Master Mix 1 deve essere caricata sulle colonne 01, 04, 07 e 10 della piastra. la soluzione di lavoro Master Mix 2 deve essere caricata sulle colonne 02, 05, 08 e 11 della piastra. la soluzione di lavoro Master Mix 3 deve essere caricata sulle colonne 03, 06, 09 e 12 della piastra.

**Nota:** è possibile caricare al massimo 30 campioni su ogni piastra. Se non è sufficiente un solo kit reagenti per trattare tutti i campioni nella piastra, utilizzare altri kit purché siano dello stesso lotto.

## Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione

### Calcolo della diluizione per le concentrazioni dello stock di DNA campione tra 2 ng/µl e 36 ng/µl

**Nota:** gli stock di DNA ottenuti dai campioni devono essere diluiti immediatamente prima dell'amplificazione e rilevazione.

**Nota:** per ogni campione vengono eseguiti tre cicli di amplificazione/rilevazione, pertanto è richiesto un volume totale di 75 µl (25 µl per ognuna delle tre reazioni) di una diluizione di 2 ng/µl dello stock di DNA (in totale 150 ng di DNA).

1. Per ogni campione calcolare il volume (µl) di stock di DNA necessario:

$$\mu\text{l di stock di DNA} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentrazione dello stock di DNA [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Per ogni campione, calcolare il volume (µl) di DNA SD necessario:

$$\mu\text{l di DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l di stock di DNA}$$

Esempio:

$$\text{Concentrazione dello stock di DNA} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \mu\text{l di stock di DNA} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$$

$$2. \mu\text{l di DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$$

### Calcolo della diluizione per le concentrazioni dello stock di DNA > 36 ng/μl

**Nota:** gli stock di DNA ottenuti dai campioni devono essere diluiti immediatamente prima dell'amplificazione e rilevazione.

**Nota:** per ogni campione vengono eseguiti tre cicli di amplificazione/rilevazione, pertanto è richiesto un volume totale di 75 μl (25 μl per ognuna delle tre reazioni) di una diluizione di 2 ng/μl dello stock di DNA (in totale 150 ng di DNA).

1. Con concentrazioni dello stock di DNA > 36 ng/μl, utilizzare la formula seguente per calcolare la quantità di **DNA SD** necessaria per preparare almeno 90 μl di stock di DNA diluito. In questo modo è certo che verranno utilizzati almeno 5 μl di stock di DNA per ogni campione.
2. Per ogni campione calcolare il volume (μl) di **DNA SD** necessario per diluire 5 μl di stock di DNA fino a 2 ng/μl:  

$$\text{Vol. di DNA SD necessario in } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l di stock di DNA} \times \text{concentrazione stock di DNA in ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Esempio:

Concentrazione dello stock di DNA = 100 ng/μl

1. Vol. di **DNA SD** necessario in μl =  $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Utilizzare il volume calcolato di **DNA SD** per diluire 5 μl di stock di DNA.

### Diluizione del campione

1. Per le diluizioni del DNA, preparare il numero appropriato di provette per microcentrifuga da 1,5 ml con tappo di chiusura ed etichettarle correttamente con le informazioni di identificazione dei campioni.
2. Utilizzando un pipettatore dotato di puntale di pipettamento con filtro antiaerosol, pipettare i volumi calcolati di **DNA SD** nelle provette precedentemente etichettate. Pipettare 45 μl di **DNA SD** in una provetta per microcentrifuga con tappo di chiusura etichettata **NEG**.
3. Agitare in vortex ogni stock di DNA e **NEG** per 5-10 secondi.
4. Utilizzando un pipettatore dotato di puntale di pipettamento con filtro antiaerosol (cambiare puntale ad ogni pipettamento), pipettare delicatamente il volume calcolato di ogni stock di DNA campione nella provetta corrispondente contenente **DNA SD**. Pipettare 45 μl di **NEG** (eluato estratto) nella provetta **NEG**.
5. Tappare le provette e agitarle in vortex, ciascuna per 5-10 secondi.
6. Sostituire i guanti.

### Preparazione della reazione

#### Preparazione delle soluzioni di lavoro MMX-1, MMX-2 e MMX-3

**Nota:** i reagenti **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** e le soluzioni di lavoro **MMX** sono fotosensibili e devono essere protetti dall'esposizione prolungata alla luce.

**Nota:** a causa della viscosità dei reagenti **PIK3CA** e della soluzione di lavoro **MMX**, pipettare lentamente per dispensare tutta la miscela dal puntale.

**Nota:** i reagenti **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** ed **PIK3CA MMX-3** potrebbero avere una colorazione azzurra-violacea. Il colore non influenza le prestazioni dei reagenti.

Preparare tre soluzioni di lavoro **MMX** differenti, una contenente **PIK3CA MMX-1**, una contenente **PIK3CA MMX-2** e l'altra contenente **PIK3CA MMX-3**, utilizzando provette per microcentrifuga da 1,5 ml separate con tappo di chiusura.

1. Calcolare il volume delle miscele **PIK3CA MMX-1** o **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** necessario per ogni soluzione di lavoro MMX utilizzando la seguente formula:

$$\text{Volume di PIK3CA MMX-1 o di PIK3CA MMX-2 o di PIK3CA MMX-3 necessario} = (\text{numero di campioni} + 2 \text{ controlli} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Calcolare il volume di **MGAC** necessario per ogni soluzione di lavoro MMX utilizzando la seguente formula:

$$\text{Volume di MGAC necessario} = (\text{numero di campioni} + 2 \text{ controlli} + 1) \times 7 \mu\text{l}$$

Fare riferimento alla Tabella 3 per determinare il volume di ogni reagente necessario per la preparazione della soluzione di lavoro MMX tenendo conto del numero di campioni inclusi nella seduta.

**Tabella 3. Volumi di reagenti necessari per creare le soluzioni di lavoro MMX-1, MMX-2 e MMX-3, in base al numero di campioni\* da analizzare**

Reagente	Volume	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µl	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
-	Vol. tot. per ogni MMX di lavoro (µl)	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

\* I volumi per "N" campioni sono calcolati sommando il numero di campioni + 2 controlli + 1

3. Prelevare il numero appropriato di provette di **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** e di **MGAC** dal luogo in cui sono conservate tra 2°C e 8°C. Prima dell'uso, agitare ogni reagente in vortex per 5 secondi, in modo tale che il liquido si raccolga sul fondo del tubo. Etichettare una provetta da microcentrifuga sterile per le soluzioni di lavoro MMX-1, MMX-2 e MMX-3.
4. Aggiungere il volume calcolato di **PIK3CA MMX-1** o **PIK3CA MMX-2** o **PIK3CA MMX-3** nella provetta con la soluzione di lavoro MMX corrispondente.
5. Aggiungere il volume calcolato di **MGAC** nelle provette con la soluzione di lavoro MMX.
6. Agitare le provette in vortex per 3-5 secondi, per ottenere una miscelazione adeguata.

**Nota:** i campioni e i controlli devono essere aggiunti alla micropiastra entro 1 ora dalla preparazione della soluzione di lavoro MMX.

**Nota:** utilizzare esclusivamente la micropiastra e la pellicola adesiva del **cobas® 4800 System**.

## Preparazione della piastra

1. Pipettare 25 µl di soluzione di lavoro MMX in ogni pozzetto di reazione della micropiastra richiesto per la seduta. Evitare che il puntale del pipettatore tocchi la piastra all'esterno del pozzetto.
  - Aggiungere la soluzione di lavoro MMX-1 (contenente **PIK3CA MMX-1**) nei pozzetti della micropiastra, nelle colonne 01, 04, 07 e 10.
  - Aggiungere la soluzione di lavoro MMX-2 (contenente **PIK3CA MMX-2**) nei pozzetti della micropiastra, nelle colonne 02, 05, 08 e 11.
  - Aggiungere la soluzione di lavoro MMX-3 (contenente **PIK3CA MMX-3**) nei pozzetti della micropiastra, nelle colonne 03, 06, 09 e 12.
2. Pipettare 25 µl di **PIK3CA MC** nei pozzetti **A01**, **A02** e **A03** della micropiastra; miscelare con cura utilizzando la pipetta per aspirare e dispensare la miscela all'interno del pozzetto almeno due volte.

- Utilizzando un nuovo puntale, pipettare 25 µl di reagente **NEG** nei pozzetti **B01**, **B02** e **B03** della micropiastra; miscelare con cura utilizzando la pipetta per aspirare e dispensare il controllo all'interno del pozzetto almeno due volte.

**Nota:** ogni seduta deve includere i controlli **PIK3CA MC** nei pozzetti **A01**, **A02** e **A03**, nonché il controllo **NEG** nei pozzetti **B01**, **B02** e **B03** altrimenti il **cobas z 480 analyzer** considererà la seduta non valida.

**Nota:** sostituire i guanti secondo necessità per prevenire la contaminazione tra campioni e la contaminazione esterna della provetta di reazione per PCR.

- Utilizzando un nuovo puntale per ogni campione di DNA diluito, aggiungere 25 µl del primo campione di DNA nei pozzetti **C01**, **C02** e **C03** della micropiastra, sostituendo il puntale per l'aggiunta del campione di DNA in ogni pozzetto. Miscelare con cura, utilizzando la pipetta per aspirare e dispensare i campioni all'interno del pozzetto almeno due volte. Ripetere questa procedura per il DNA diluito di ogni campione e seguire il modello nella Tabella 2 finché tutti i campioni di DNA non saranno stati caricati sulla micropiastra. Assicurarsi che tutto il liquido si raccolga sul fondo dei pozzetti.
- Coprire la micropiastra con la pellicola adesiva (in dotazione con le piastre). Utilizzare l'applicatore per assicurare che la pellicola adesiva aderisca perfettamente alla superficie della micropiastra.
- Prima di avviare la PCR, verificare che tutto il liquido si sia raccolto sul fondo di ogni pozzetto.

**Nota:** l'amplificazione e la rilevazione devono essere avviate entro 1 ora dall'aggiunta del primo DNA campione diluito alla soluzione di lavoro **MMX**.

## Avvio della PCR

Per istruzioni dettagliate sui singoli passaggi del flusso di lavoro PIK3CA, fare riferimento all'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**. Quando viene visualizzata la finestra popup "Select test", selezionare il tipo di flusso di lavoro "PCR Only", quindi "PIK3CA P1" e fare clic su "OK".

# Risultati

## Interpretazione dei risultati

**Nota:** la validazione di tutte le sedute e dei campioni viene eseguita dal **cobas® 4800 software**.

**Nota:** una seduta di analisi valida può includere risultati dei campioni sia validi che non validi.

Se una seduta è valida, i risultati dei campioni possono essere interpretati con le modalità descritte nella Tabella 4.

**Tabella 4. Interpretazione dei risultati del test cobas PIK3CA**

Risultato del test	Risultato della mutazione	Interpretazione
Mutation Detected	R88Q	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	N345K	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	C420R	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	E542K	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	E545X (E545A, E545D*, E545G o E545K)	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	Q546X (Q546E, Q546K, Q546L o Q546R)	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	M1043I**	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	H1047X (H1047L, H1047R o H1047Y)	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	G1049R	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
Mutation Detected	(È possibile che siano presenti più mutazioni)	Mutazione rilevata nella regione PIK3CA target specifica
No Mutation Detected	N/D	Nessuna mutazione rilevata nelle regioni PIK3CA target
Non valido	N/D	Risultato del campione non valido. Ripetere il test sui campioni con risultati non validi facendo riferimento alle istruzioni contenute nella sezione "Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi", più avanti.
Failed	N/D	La seduta non è riuscita a causa di un errore hardware o software. Richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido E545D, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.1635G>T.

\*\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido M1043I, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.3129G>T.

**Nota:** un risultato "No Mutation Detected" non esclude la presenza di una mutazione nelle regioni PIK3CA target, in quanto i risultati dipendono da svariati fattori: percentuale delle sequenze mutate, integrità del campione, assenza di inibitori e DNA sufficiente per la rilevazione.

## Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi

1. Ripetere la diluizione dello stock di DNA campione non valido partendo dai passaggi "Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione" e "Diluizione del campione", descritti nella sezione **Amplificazione e rilevazione**.
2. Dopo avere eseguito la diluizione dello stock di DNA fino a 2 ng/µl (vedere le istruzioni per la "Diluizione del campione"), proseguire con la "Preparazione delle soluzioni di lavoro MMX-1, MMX-2 e MMX-3" e completare i passaggi restanti della procedura di amplificazione e rilevazione.

**Nota:** se il campione continua ad essere non valido dopo la ripetizione del test, o se lo stock di DNA non era sufficiente per preparare un'altra diluizione (passaggio A della procedura Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi), ripetere l'intera procedura di analisi per il campione in questione, partendo dalla deparaffinazione e dall'estrazione del DNA da una nuova sezione tumorale FFPE di 5 µm.

## Controllo di qualità e validità dei risultati

In ogni seduta con massimo 30 campioni è necessario utilizzare un set di **PIK3CA MC** del test **cobas PIK3CA** (pozzetti **A01**, **A02** e **A03**) e un controllo negativo (**NEG**) (pozzetti **B01**, **B02** e **B03**) per le soluzioni di lavoro MMX-1, MMX-2 e MMX-3. La seduta è valida se i controlli **PIK3CA MC** e **NEG** sono validi. Se uno dei controlli **PIK3CA MC** o **NEG** non è valido, l'intera seduta non è valida e deve essere ripetuta. Preparare una diluizione fresca dello stock di DNA campione estratto in precedenza, in modo da allestire una nuova micropiastre con i controlli per l'amplificazione e la rilevazione.

### Controllo mutante

Il risultato del controllo **PIK3CA MC** deve essere "Valid". Se il controllo **PIK3CA MC** genera costantemente risultati non validi, richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

### Controllo negativo

Il risultato del controllo **NEG** deve essere "Valid". Se il controllo **NEG** genera costantemente risultati non validi, rivolgersi all'ufficio Roche locale per richiedere assistenza tecnica.

## Limiti della procedura

1. Analizzare soltanto i tipi di campioni indicati. Il test **cobas PIK3CA** è stato verificato con i campioni FFPET di BC.
2. Il test **cobas PIK3CA** è approvato soltanto per l'uso con il **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (Roche M/N: 05985536190).
3. La rilevazione di una mutazione dipende dal numero di copie presenti nel campione e può essere influenzata dall'integrità del campione, dalla quantità di DNA estratto e dalla presenza di sostanze interferenti.
4. L'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza delle procedure di fissazione, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Attenersi alle procedure descritte nelle Istruzioni per l'uso del **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190), a queste Istruzioni per l'uso e all'Assistenza Utente - **cobas® 4800 System**.
5. Non sono stati valutati gli effetti di altre potenziali variabili, ad esempio la fissazione dei campioni.
6. Sebbene l'aggiunta dell'enzima AmpErase alla soluzione Master Mix del test **cobas PIK3CA** garantisca l'amplificazione selettiva del DNA target, è necessario evitare la contaminazione dei reagenti attenendosi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte nelle presenti Istruzioni per l'uso.
7. L'uso di questo prodotto deve essere consentito esclusivamente a personale adeguatamente addestrato nelle tecniche PCR e nell'uso del **cobas® 4800 System**.
8. Questo prodotto è stato verificato soltanto per l'uso con il **cobas z 480 analyzer**. Non è consentito l'uso di altri termociclatori per rilevazione ottica real-time con questo prodotto.
9. A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori allo scopo di qualificare tali differenze.
10. L'eventuale presenza di inibitori della PCR può causare risultati falsi negativi o non validi.
11. Anche se raramente, le mutazioni nelle regioni del DNA genomico del gene PIK3CA coperte dai primer o dalle sonde del test **cobas PIK3CA** potrebbero causare errori nei risultati.

12. Anche se raramente, il test **cobas** PIK3CA manifesta alcune limitate reazioni crociate (risultati “Mutation Detected”) per le mutazioni adiacenti alle mutazioni target negli esoni 10 e 21 (ad esempio, nel caso della mutazione E545K in percentuali elevate potrebbe essere indicata erroneamente la mutazione E545X;Q546X, oppure nel caso della mutazione H1047X potrebbe essere indicata erroneamente la mutazione H1047X;G1049R).
13. Il test **cobas** PIK3CA è stato approvato per l'uso con 50 ng di DNA per pozzetto di reazione. Si sconsiglia di utilizzare quantità iniziali di DNA inferiori a 50 ng per pozzetto di reazione.
14. Il test **cobas** PIK3CA è un saggio qualitativo. Il test non è destinato alle misurazioni quantitative della percentuale di mutazione.
15. I campioni FFPET di BC che contengono DNA degradato potrebbero alterare la capacità del test di rilevare le mutazioni PIK3CA.
16. I campioni che generano il risultato “No Mutation Detected” potrebbero celare mutazioni PIK3CA che non vengono rilevate dal saggio.
17. Anche se raramente, i campioni che contengono quasi il doppio delle mutazioni sullo stesso filamento di DNA potrebbero interferire con la rilevazione di una delle due mutazioni (ad esempio, P539R (CCT>CGT) potrebbe interferire con la rilevazione di E542K, oppure Y343Y (TAC>TAT) potrebbe interferire con la rilevazione di N345K).

## Valutazione delle prestazioni non cliniche

*Nota:* nelle descrizioni dello studio riportate di seguito sono inclusi i dati cumulativi ottenuti con i test **cobas** PIK3CA.

Per gli studi non clinici descritti di seguito, il contenuto percentuale del tumore è stato valutato con un esame istologico. Per selezionare i campioni da analizzare sono stati utilizzati il sequenziamento bidirezionale di Sanger e il sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS). La percentuale di mutazione nel campione FFPET di BC è stata determinata con un metodo NGS.

## Caratteristiche delle prestazioni

### Sensibilità analitica e limite del bianco (LoB)

Per valutare le prestazioni del test **cobas** PIK3CA ed evitare che i campioni wild-type (WT) generino un segnale analitico indicativo di una bassa concentrazione della mutazione, sono stati valutati i campioni FFPET di BC contenenti PIK3CA di tipo WT. Il limite del bianco (LoB) è stato determinato utilizzando l'opzione non parametrica descritta nelle linee guida EP17-A2<sup>18</sup> del CLSI per i campioni PIK3CA WT. È stato determinato un limite del bianco pari a zero per tutte le mutazioni.

### Limite di sensibilità con le miscele di campioni FFPET

Il DNA estratto da 33 campioni FFPET di BC contenenti PIK3CA mutante è stato miscelato con il DNA estratto da 25 campioni di BC contenenti PIK3CA WT, in modo tale da ottenere 42 miscele di DNA uniche, con livelli di mutazione del 10,0%, del 7,5%, del 5,0%, del 2,5%, e dell'1,0% determinati con un metodo NGS. Sono state preparate le diluizioni di ogni miscela di DNA campione e, in totale, sono stati analizzati 21 replicati per livello di mutazione, utilizzando tre lotti del kit del test **cobas** PIK3CA (n = 21/componenti del pannello). Il limite di sensibilità di ogni campione è stato determinato in base alla percentuale di mutazione PIK3CA più bassa ad aver generato una percentuale di risultati “Mutation Detected” di almeno il 95% per la mutazione target (Tabella 5).

Tabella 5. Limite di sensibilità del test cobas PIK3CA con le miscele di DNA dei campioni FFPET

Esone PIK3CA	Mutazione PIK3CA	Sequenza di acido nucleico PIK3CA	ID COSMIC <sup>12</sup>	Campione	Mutazione percentuale nel componente del pannello per ottenere ≥ 95% di risultati "Mutation Detected" con 50 ng di DNA iniziale per pozzetto di reazione (N = 21 ripetizioni)
2	R88Q	263 G>A	746	Campione 1	2,2%
2	R88Q	263 G>A	746	Campione 2	1,3%
2	R88Q	263 G>A	746	Campione 3	1,1%
5	N345K	1035 T>A	754	Campione 4	2,2%
5	N345K	1035 T>A	754	Campione 5	1,9%
5	N345K	1035 T>A	754	Campione 6	1,3%
8	C420R	1258 T>C	757	Campione 7	1,7%
8	C420R	1258 T>C	757	Campione 8	1,9%
8	C420R	1258 T>C	757	Campione 9	1,6%
10	E542K	1624 G>A	760	Campione 10	1,1%
10	E542K	1624 G>A	760	Campione 11	1,2%
10	E542K	1624 G>A	760	Campione 12	1,1%
10	E545A	1634 A>C	12458	Campione 13	2,8%
10	E545A	1634 A>C	12458	Campione 14	0,9%
10	E545A	1634 A>C	12458	Campione 15	1,6%
10	E545G	1634 A>G	764	Campione 16	1,8%
10	E545G	1634 A>G	764	Campione 17	1,2%
10	E545G	1634 A>G	764	Campione 18	1,6%
10	E545K	1633 G>A	763	Campione 19	3,3%
10	E545K	1633 G>A	763	Campione 20	1,5%
10	E545K	1633 G>A	763	Campione 21	1,8%
10	Q546E	1636 C>G	6147	Campione 22	3,5%
10	Q546E	1636 C>G	6147	Campione 23	1,6%
10	Q546E	1636 C>G	6147	Campione 24	2,5%
10	Q546K	1636 C>A	766	Campione 25	3,4%
10	Q546K	1636 C>A	766	Campione 26	2,3%
10	Q546K	1636 C>A	766	Campione 27	2,7%
10	Q546R	1637 A>G	12459	Campione 28	1,5%
10	Q546R	1637 A>G	12459	Campione 29	3,2%
10	Q546R	1637 A>G	12459	Campione 30	1,3%
21	H1047L	3140 A>T	776	Campione 31	2,8%
21	H1047L	3140 A>T	776	Campione 32	1,8%
21	H1047L	3140 A>T	776	Campione 33	3,3%
21	H1047R	3140 A>G	775	Campione 34	2,8%
21	H1047R	3140 A>G	775	Campione 35	1,5%
21	H1047R	3140 A>G	775	Campione 36	1,0%
21	H1047Y	3139 C>T	774	Campione 37	3,5%
21	H1047Y	3139 C>T	774	Campione 38	2,2%
21	H1047Y	3139 C>T	774	Campione 39	3,4%
21	G1049R	3145 G>C	12597	Campione 40	1,0%
21	G1049R	3145 G>C	12597	Campione 41	0,7%
21	G1049R	3145 G>C	12597	Campione 42	1,0%

Il test **cobas** PIK3CA ha identificato le mutazioni target nel gene PIK3CA con un livello di mutazione percentuale compreso tra lo 0,7% e il 3,5%, data una quantità iniziale di DNA di 50 ng/PCR.

## Rilevazione dei genotipi rari con i plasmidi

Per le tre mutazioni PIK3CA elencate nella Tabella 6, un costrutto di DNA plasmidico è stato miscelato con il DNA WT per preparare campioni con bassa percentuale di DNA mutante. In totale sono stati analizzati 20 replicati per ogni miscela contenente i plasmidi, ad una concentrazione iniziale di 50 ng di DNA, utilizzando almeno un lotto del kit del test **cobas** PIK3CA. Il limite di confidenza superiore al 95%, in base alla distribuzione binomiale, è riportato per ogni miscela contenente i plasmidi nella Tabella 6.

**Tabella 6. Mutazioni rilevate dal test cobas PIK3CA con miscele di DNA plasmidico mutante**

Esone PIK3CA	Mutazione PIK3CA	Sequenza di acido nucleico PIK3CA	ID COSMIC <sup>12</sup>	Mutazione percentuale effettiva	Limite di confidenza superiore al 95%, in base alla distribuzione binomiale (N ≥ 20)	Limite di confidenza inferiore al 95%, in base alla distribuzione binomiale (N ≥ 20)
10	E545D	1635 G>T	765	1,2%	62%	97%
10	Q546L	1637 A>T	25041	2,1%	83%	100%
21	M1043I	3129 G>T	773	2,6%	83%	100%

## Ripetibilità

La ripetibilità del test **cobas** PIK3CA è stata valutata utilizzando 10 campioni FFPET così costituiti: due campioni WT e otto campioni mutanti, ognuno con una mutazione E542K, N345K, E545K, C420R, G1049R, Q546K, R88Q o H1047R. Questi campioni sono stati analizzati in duplicato da due operatori, utilizzando due lotti di reagenti diversi e due **cobas z** 480 analyzer nell'arco di 8 giorni. In totale sono stati valutati 32 replicati di ogni campione. Il test **cobas** PIK3CA ha generato risultati corretti nel 99,7% dei casi (319/320).

## Correlazione con un metodo di riferimento

Sono stati eseguiti test comparativi su 206 campioni FFPET di BC, utilizzando 2 lotti di test **cobas** PIK3CA e il sequenziamento di Sanger, con lo scopo di definire la concordanza percentuale positiva, negativa e complessiva tra i metodi. I risultati discordanti tra il test **cobas** PIK3CA e il sequenziamento di Sanger sono stati sottoposti al metodo NGS per risolvere la discordanza.

## Risultati del test cobas PIK3CA e del sequenziamento di Sanger

Il confronto dei 205 risultati validi con il sequenziamento di Sanger e con il test **cobas** PIK3CA è illustrato nella Tabella 7.

**Tabella 7. Analisi della concordanza tra il test cobas PIK3CA e il sequenziamento di Sanger**

	Sanger, MD	Sanger, NMD	Totale
<b>cobas</b> PIK3CA Test, MD	95*	7	102
<b>cobas</b> PIK3CA Test, NMD	0	103	103
<b>cobas</b> PIK3CA Test, Invalid	0	1	1
<b>Totale</b>	95	111	206

Concordanza positiva = 100% (IC 95% = 96,1-100%)

Concordanza negativa = 93,6% (IC 95% = 87,4-96,9%)

Concordanza totale = 96,6% (IC 95% = 93,1-98,3%)

MD: Mutation Detected

NMD: No Mutation Detected

\* Cinque campioni per il Lotto 1 e tre campioni per il Lotto 2 hanno generato risultati MD sia con il sequenziamento di Sanger che con il test **cobas** PIK3CA, anche se il sequenziamento di sangue ha rilevato la prima mutazione ma ha mancato la seconda (Tabella 9).

Per il confronto tra il test **cobas** PIK3CA e il sequenziamento di Sanger sono stati valutati 9 target per ogni campione. In totale sono stati classificati 1845 campioni sulla base dei risultati di 205 campioni validi. La Tabella 8 mostra il confronto tra il test **cobas** PIK3CA e il sequenziamento di Sanger per i singoli risultati del Lotto 1.

**Tabella 8. Confronto per singoli risultati tra il test cobas® PIK3CA e il sequenziamento di Sanger (Lotto 1)**

	Sanger, R88Q	Sanger, N345K	Sanger, C420R	Sanger, E542K	Sanger, E545X	Sanger, Q546X	Sanger, M1043I	Sanger, H1047X	Sanger, G1049R	Sanger, NMD	Totale
Test <b>cobas</b> PIK3CA, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Test <b>cobas</b> PIK3CA, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Test <b>cobas</b> PIK3CA, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
Test <b>cobas</b> PIK3CA, E542K	-	-	-	14	-	-	-	-	-	2	16
Test <b>cobas</b> PIK3CA, E545X	-	-	-	-	17	-	-	-	-	2	19
Test <b>cobas</b> PIK3CA, Q546X	-	-	-	-	-	8	-	-	-	1*	9
Test <b>cobas</b> PIK3CA, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Test <b>cobas</b> PIK3CA, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	42	-	7*	49
Test <b>cobas</b> PIK3CA, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
Test <b>cobas</b> PIK3CA, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738	1738
Test <b>cobas</b> PIK3CA, Invalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
<b>Totale</b>	1	7	3	14	17	8	0	42	3	1759	1854

\*I risultati relativi al Lotto 2 sono simili a quelli del Lotto 1, tranne per il fatto che il Lotto 2 ha generato due risultati discordanti in meno. Vedere il Campione 8 e il Campione 9 nella Tabella 9.

### Analisi dei risultati discordanti con il metodo NGS

Per le mutazioni di 7 campioni, il sequenziamento di Sanger e il test **cobas** PIK3CA hanno prodotto risultati discordanti. Per le mutazioni di altri 5 campioni, invece, i risultati ottenuti erano concordanti, ma il test **cobas** PIK3CA ha identificato una mutazione in più in ogni campione. Tutti questi 12 campioni sono stati analizzati con un metodo NGS, i cui risultati sono riportati nella Tabella 9. Sulla base dei risultati del metodo NGS è stata eseguita una nuova analisi della concordanza. In questa analisi, sono stati dichiarati concordanti i campioni i cui risultati con il metodo NGS concordavano con quelli ottenuti con il test **cobas** PIK3CA.

**Tabella 9. Risoluzione dei risultati discordanti con il metodo NGS**

Campione	Sanger	Test cobas PIK3CA, Lotto 1	Risoluzione con metodo NGS, Lotto 1**	Test cobas PIK3CA, Lotto 2	Risoluzione con metodo NGS, Lotto 2**
Campione 1	NMD	H1047X	H1047R (mutazione 3,4%)	H1047X	H1047R (mutazione 2,5%)
Campione 2	NMD	E542K	E542K (mutazione 4,8%)	E542K	E542K (mutazione 3,4%)
Campione 3	NMD	H1047X	H1047R (mutazione 2,0%)	H1047X	H1047R (mutazione 2,8%)
Campione 4	NMD	E542K	E542K (mutazione 10,1%)	E542K	E542K (mutazione 8,3%)
Campione 5	NMD	E545X	E545K (mutazione 4,3%)	E545X	E545K (mutazione 2,2%)
Campione 6	NMD	H1047X	H1047R (mutazione 5,1%); H1047Y (mutazione 1,1%)	H1047X	H1047R (mutazione 4,1%)
Campione 7	NMD	E545X	E545K (mutazione 17,2%)	E545X	E545K (mutazione 25,6%)
Campione 8*	H1047L	H1047X; Q546X	Q546K (mutazione 2,2%)	H1047X	N/D
Campione 9*	Q546R	H1047X; Q546X	H1047R (mutazione 0,6%); H1047Y (mutazione 0,4%)	Q546X	N/D
Campione 10	C420R	H1047X; C420R	H1047R (mutazione 0,9%)	H1047X; C420R	H1047R (mutazione 1,1%)
Campione 11	E545K	H1047X; E545X	H1047R (mutazione 1,7%)	H1047X; E545X	H1047R (mutazione 1,8%)
Campione 12	Q546E	H1047X; Q546X	H1047R (mutazione 6,7%)	H1047X; Q546X	H1047R (mutazione 5,4%)

\* I campioni 8 e 9 hanno prodotto risultati discordanti tra il Lotto 1 e il Lotto 2. I risultati del Lotto 2 concordavano con il sequenziamento di Sanger, pertanto non sono stati necessari test di risoluzione.

\*\* Il metodo NGS è stato applicato per la risoluzione dei risultati solo nel caso di esoni con risultati discordanti.

**Nota:** per i campioni 8-12, il test **cobas PIK3CA** ha identificato le stesse mutazioni **PIK3CA** del sequenziamento di Sanger, ma ha anche identificato ulteriori mutazioni confermate con il metodo NGS.

Dopo aver risolto i risultati discordanti tra il test **cobas PIK3CA** e il sequenziamento di Sanger applicando il metodo NGS, la concordanza complessiva tra il test **cobas PIK3CA** e il metodo del sequenziamento è risultata essere del 100% per tutte le mutazioni target per ogni lotto (Tabella 10).

**Tabella 10. Analisi della concordanza tra il test cobas PIK3CA e il sequenziamento di Sanger con risoluzione delle discordanze tramite il metodo NGS (Sanger+NGS)**

	Sanger+NGS, MD	Sanger+NGS, NMD	Totale
<b>cobas PIK3CA Test, MD</b>	102	0	102
<b>cobas PIK3CA Test, NMD</b>	0	103	103
<b>cobas PIK3CA Test, Invalid</b>	0	1	1
<b>Totale</b>	102	104	206

Concordanza positiva = 100% (IC 95% = 96,4-100%)

Concordanza negativa = 100% (IC 95% = 96,4-100%)

Concordanza totale = 100% (IC 95% = 98,2-100%)

La Tabella 11 mostra il confronto tra il test **cobas** PIK3CA e il sequenziamento di Sanger con risoluzione delle discordanze tramite il metodo NGS per i singoli risultati del Lotto 1.

**Tabella 11. Analisi dei singoli risultati con confronto tra il test cobas PIK3CA e il sequenziamento di Sanger con risoluzione delle discordanze tramite il metodo NGS (Sanger+NGS)**

	Sanger+ NGS, R88Q	Sanger+ NGS, N345K	Sanger+ NGS, C420R	Sanger+ NGS, E542K	Sanger+ NGS, E545X	Sanger+ NGS, Q546X	Sanger+ NGS, M1043I	Sanger+ NGS, H1047X	Sanger+ NGS, G1049R	Sanger+ NGS, NMD	<b>Totale</b>
Test <b>cobas</b> PIK3CA, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Test <b>cobas</b> PIK3CA, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Test <b>cobas</b> PIK3CA, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
Test <b>cobas</b> PIK3CA, E542K	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	16
Test <b>cobas</b> PIK3CA, E545X	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19
Test <b>cobas</b> PIK3CA, Q546X	-	-	-	-	-	9*	-	-	-	-	9
Test <b>cobas</b> PIK3CA, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Test <b>cobas</b> PIK3CA, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	49*	-	-	49
Test <b>cobas</b> PIK3CA, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
Test <b>cobas</b> PIK3CA, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738*	1738
Test <b>cobas</b> PIK3CA, Invalid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
<b>Totale</b>	1	7	3	16	19	9	0	49	3	1747	1854

\* I risultati del Lotto 2 sono simili a quelli del Lotto 1, tranne per il fatto che, in totale, sono state rilevate due mutazioni in meno dal test **cobas** PIK3CA e Sanger+NGS. Vedere il Campione 8 e il Campione 9 nella Tabella 9. Il Lotto 2 presentava due risultati NMD in più e, contestualmente, una mutazione Q546X in meno e una mutazione H1047X in meno.

## Reattività crociata

Per determinare la reattività crociata, sono state analizzate le seguenti mutazioni non target utilizzando circa il 50% di DNA plasmidico rispetto al volume iniziale di DNA genomico: M1043I, M1043V, M1043T, G1049S, G1049A, E542V, E542Q, E545D, E545V, E545Q, Q546P, Q546H e pseudogene PIK3CA. Queste mutazioni non target non hanno causato reazioni crociate (o interferenze) con il test **cobas** PIK3CA quando sono state aggiunte ai campioni contenenti le sequenze di PIK3CA WT e mutante.

## Valutazione delle potenziali sostanze interferenti

### Sostanze endogene

I trigliceridi ( $\leq 37$  mM, concentrazione alta raccomandata dal CLSI<sup>19</sup>) e l'emoglobina ( $\leq 2$  mg/ml, concentrazione alta raccomandata dal CLSI<sup>19</sup>) non hanno interferito con il test **cobas** PIK3CA quando sono stati aggiunti ai campioni durante la loro preparazione. Inoltre i campioni contenenti fino al 90% di tessuto adiposo non hanno interferito con il test **cobas** PIK3CA.

### Sostanze esogene

È stata analizzata l'interferenza delle seguenti sostanze farmaceutiche: letrozolo (107,25 ng/ml), anastrozolo (91,20 ng/ml), capecitabina (11,97 ng/ml), tamoxifene (111,0 ng/ml), exemestane (66,9 ng/ml), everolimus (47,1 ng/ml), paclitaxel (10950,0 ng/ml), docetaxel (16,50 µg/ml), ciclofosfamide (603 µg/ml), doxorubicina (1998,4 ng/ml) e fulvestrant (84 ng/ml).

Questi farmaci non hanno interferito con il test **cobas** PIK3CA quando sono stati aggiunti ai campioni durante la loro preparazione.

### Tessuto necrotico

I campioni FFPET di BC con contenuto di tessuto necrotico fino al 55% (nel caso di campioni PIK3CA mutante) e fino al 70% (nel caso di campioni WT) non hanno interferito con i risultati del test **cobas** PIK3CA.

# Valutazione delle prestazioni cliniche

## Studio di riproducibilità clinica

Per valutare la riproducibilità del test **cobas** PIK3CA è stato realizzato uno studio presso 3 laboratori (1 esterno e 2 interni), che ha coinvolto 2 operatori per laboratorio, 3 lotti di reagenti e 5 giornate di lavoro non consecutive, su un pannello di 21 campioni di DNA estratti da sezioni di campioni FFPET di BC wild-type (WT) e mutante (MT), ottenuti da una biobanca commerciale preposta alla conservazione di campioni di tessuto. Il pannello includeva le mutazioni negli esoni 2, 5, 8, 10 e 21, confermate tramite sequenziamento del DNA. In totale sono stati eseguiti 3780 test sui 21 componenti del pannello in 90 sedute valide: tutti i risultati generati sono validi. Non sono stati ottenuti risultati “Mutation Detected” per nessuno dei 180 test validi eseguiti sui componenti del pannello WT, pertanto la concordanza è stata del 100%. Per 19 componenti del pannello MT, su un totale di 20, la concordanza è stata del 100%. Per il componente del pannello Esone 10 E545 - LoD, la concordanza è stata del 99,4% (179 risultati su 180 test eseguiti erano “Mutation Detected”). La concordanza totale tra i risultati è riportata nella Tabella 12. Il coefficiente di variazione (CV) in tutti i componenti del pannello è stato < 2%. Per i controlli esterni, il CV è stato < 1,9%. Il CV% tra i lotti è stato < 0,4%; con riferimento allo stesso lotto è stato < 1,9%.

**Tabella 12. Stime totali di concordanza per ogni componente del pannello rispetto allo studio sulla riproducibilità**

Componente del pannello	Numero di test validi	Concordanza N	Concordanza % (IC 95%) <sup>a</sup>
Wild-type	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 5 N345K - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E542K - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E545K - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 H1047L - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 G1049R - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 5 N345K - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E542K - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E545K - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 H1047L - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 G1049R - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 2 R88Q - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 8 C420R - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E545A - LoD	180	179	99,4 (96,9, 100,0)
Esone 10 Q546K - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 H1047R - LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 2 R88Q - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 8 C420R - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 E545A - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 10 Q546K - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Esone 21 H1047R - 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

**Nota:** i risultati sono stati considerati concordanti quando un campione del pannello Mutante ha generato un risultato “Mutation Detected” valido, o quando un campione del pannello Wild Type ha generato un risultato “No Mutation Detected” valido.

<sup>a</sup> IC 95% = intervallo di confidenza al 95% esatto.

Per riepilogare, la riproducibilità del test **cobas** PIK3CA per l'identificazione delle mutazioni negli esoni 2, 5, 8, 10 e 21 del gene PIK3CA nel DNA estratto da campioni FFPET di tumore umane del seno è stata eccellente e la concordanza è stata > 99% per tutte le mutazioni valutate in questo studio.

# Flag dei risultati

## Spiegazione dei flag dei risultati

L'origine di un flag è indicata dal codice del flag stesso, come illustrato nella Tabella 13.

**Tabella 13. Origine del flag**

Il codice inizia per	Origine del flag	Esempio
M*	Motivi vari o altri	M6
R	Interpretazione del risultato	R500
Z*	Analizzatore	Z1

\* Fare riferimento all'Assistenza Utente - **cobas**® 4800 System.

Tutti i flag dei risultati del sistema che sono rilevanti per l'utente sono elencati nella Tabella 14.

**Tabella 14. Elenco dei flag per l'interpretazione dei risultati**

Codice flag	Descrizione	Azione consigliata
R500-R511	Non è stato possibile rilevare il controllo mutante	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che l'algoritmo per la determinazione del ciclo soglia è incappato in un errore. Ciò può verificarsi in presenza di fluorescenza con pattern atipico o disturbato.
R512-R523	Non è stato possibile rilevare il controllo mutante	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che è stato generato un risultato negativo per il controllo mutante (cioè il DNA del controllo mutante potrebbe non essere stato aggiunto a uno o più pozzetti).
R524-R535	Il controllo mutante è fuori intervallo.	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che un valore Ct osservato per il controllo mutante era al di sotto della soglia fissata (ciclo soglia troppo basso). Questo errore può verificarsi in caso di contaminazione del DNA.
R536-R547	Il controllo mutante è fuori intervallo.	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che un ciclo soglia osservato per il controllo mutante era al di sopra della soglia fissata (ciclo soglia troppo alto). Questo errore può verificarsi nei seguenti casi: 1. Preparazione errata della soluzione di lavoro Master Mix. 2. Errore di pipettamento durante l'aggiunta della soluzione di lavoro Master Mix in un pozzetto della micropiastra. 3. Errore di pipettamento durante l'aggiunta del controllo mutante in uno dei pozzetti della micropiastra.
R548-R559	Non è stato possibile rilevare il controllo negativo	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che l'algoritmo per la determinazione del ciclo soglia è incappato in un errore. Ciò può verificarsi in presenza di fluorescenza con pattern atipico o disturbato.
R560-R571	Il controllo negativo è fuori intervallo.	Ripetere la seduta. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano l'esistenza di un risultato positivo per il controllo negativo (in altre parole, si è verificata una contaminazione).

<b>Codice flag</b>	<b>Descrizione</b>	<b>Azione consigliata</b>
R572-R583	Non è stato possibile rilevare un target	Ripetere il campione. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che l'algoritmo per la determinazione del ciclo soglia è incappato in un errore. Ciò può verificarsi in presenza di fluorescenza con pattern atipico o disturbato.
R584-R586, R588-R590, R592-R594, R596-R604	Il risultato è fuori intervallo.	Ripetere il campione. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano, alternativamente, che: 1. Nel campione è stato osservato un ciclo soglia atipicamente basso per il campione, oppure 2. Nel campione è stata osservata una relazione atipica tra il ciclo soglia del mutante e il ciclo soglia del controllo interno.
R587, R591, R595	Il controllo interno è fuori intervallo.	Ripetere il campione. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che nel campione è stato osservato un ciclo soglia del controllo interno atipicamente basso. Ciò potrebbe verificarsi nel caso in cui la miscela PCR sia significativamente sovraccarica di DNA genomico concentrato.
R605-R610	Non è stato possibile rilevare il controllo interno	Ripetere il campione. Vedere la sezione <b>Procedura del test</b> . Questi codici dei flag indicano che il risultato del controllo interno per il campione non era valido. L'assenza di un risultato valido per il controllo interno è indicativa di: 1. Scarsa qualità del DNA genomico ottenuto dal campione. 2. Trattamento inadeguato del campione. 3. Presenza di inibitori della PCR nel campione. 4. Presenza di mutazioni rare nelle regioni del DNA genomico coperte dai primer e/o dalle sonde del controllo interno. 5. DNA campione non aggiunto in uno o più pozzetti, oppure 6. Altre cause.

# Informazioni supplementari

## Caratteristiche specifiche del test

<b>Tipo di campione</b>	Tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPET)
<b>Quantità minima di campione richiesta</b>	Sezione FFPET di 5 µm
<b>Sensibilità analitica</b>	5% di sequenza mutante in 50 ng di DNA
<b>Specificità analitica</b>	Concordanza del 100% con sequenziamento R88Q N345K C420R E542K
<b>Genotipi identificati</b>	E545X (E545A, E545D*, E545G o E545K) Q546X (Q546E, Q546K, Q546L o Q546R) M1043I** H1047X (H1047L, H1047R o H1047Y) G1049R

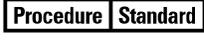
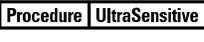
\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido E545D, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.1635G>T.

\*\* Per quanto riguarda la sostituzione dell'amminoacido M1043I, il test può rilevare solo la mutazione nucleotidica c.3129G>T.

## Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

**Tabella 15. Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche**

 <b>Age/DOB</b>	Età o data di nascita		Dispositivo non idoneo ai test POC	 <b>QS IU/PCR</b>	UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
	Software ausiliario		Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	 <b>SN</b>	Numero di serie
 <b>Assigned Range [copies/mL]</b>	Intervallo assegnato (copie/ml)		Distributore <i>(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)</i>	 <b>Site</b>	Laboratorio
 <b>Assigned Range [IU/mL]</b>	Intervallo assegnato (UI/ml)		Non riutilizzare	 <b>Procedure Standard</b>	Procedura standard
 <b>EC REP</b>	Mandatario nella Comunità Europea		Femmina	 <b>STERILE EO</b>	Sterilizzazione con ossido di etilene
 <b>BARCODE</b>	Foglio di dati del barcode		Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Conservare al buio
 <b>LOT</b>	Codice del batch	 <b>GTIN</b>	Global Trade Item Number		Limiti di temperatura
	Rischio biologico		Importatore		File di definizione del test
 <b>REF</b>	Numero di catalogo	 <b>IVD</b>	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Alto
	Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	 <b>LLR</b>	Limite inferiore dell'intervallo assegnato	 <b>Procedure UltraSensitive</b>	Procedura ultrasensibile
 <b>Collect Date</b>	Data di raccolta		Maschio	 <b>UDI</b>	Identificazione univoca del dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Fabbricante	 <b>ULR</b>	Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Contenuto sufficiente per <n> test	 <b>CONTROL -</b>	Controllo negativo	 <b>Urine Fill Line</b>	Riga di riempimento urina
 <b>CONTENT</b>	Contenuto del kit		Non sterile	 <b>Rx Only</b>	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
 <b>CONTROL</b>	Controllo		Nome del paziente		Utilizzare entro la data
	Data di produzione		Numero del paziente		
	Dispositivo idoneo ai test POC		Staccare qui		
	Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	 <b>CONTROL +</b>	Controllo positivo		
		 <b>QS copies / PCR</b>	Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.		

## Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Fabbricante

Tabella 16. Fabbricante



Fabbricato negli USA

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Prodotto in USA

## Marchi e brevetti

Vedere <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

## Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



## Bibliografia

1. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1075-83. PMID: 20085938.
2. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:615-75. PMID: 11687500.
3. Workman P, Clarke P. P13 Kinase in Cancer: From Biology to Clinic. ASCO 2012 Educational Book. Available at: [https://ascopubs.org/doi/pdf/10.14694/EdBook\\_AM.2012.32.89](https://ascopubs.org/doi/pdf/10.14694/EdBook_AM.2012.32.89). Accessed September 3, 2020.
4. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell.* 2005;7:561-73. PMID: 15950905.
5. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:489-501. PMID: 12094235.
6. van der Heijden MS, Bernards R. Inhibition of the PI3K pathway: hope we can believe in? *Clin Cancer Res.* 2010;16:3094-9. PMID: 20400520.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90. PMID: 21296855.
8. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004;304:554. PMID: 15016963.
9. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68:6084-91. PMID: 18676830.
10. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA oncology.* 2019;5:1749-68. PMID: 31560378.
11. Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. The Cancer Atlas. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2006.
12. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer.* 2004;91:355-8. PMID: 15188009.
13. LRG. LRG\_310 – Gene: PIK3CA. Available at: [http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG\\_310.xml](http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG_310.xml). Accessed September 3, 2020.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
15. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
17. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 61st Edition. 2020.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline–Second Edition. CLSI Document EP7-A2E Appendix D. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

## Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 2.0 08/2023	<p>Aggiornamento per inserimento dei requisiti IVDR.</p> <p>Correzione di 3 refusi nella nomenclatura dei nucleotidi e delle proteine nella Tabella 1.</p> <p>Aggiunta di un riferimento alle perdite nella sezione <b>Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti</b>.</p> <p>Aggiunta di riferimenti alle procedure da seguire e agli incidenti gravi nella sezione <b>Avvertimenti e precauzioni</b>.</p> <p>Inserimento di informazioni sulla concentrazione nella sezione relativa <b>Sostanze esogene</b>.</p> <p>Aggiornamento della sezione <b>Materiali aggiuntivi necessari</b> e rimozione del riferimento ai materiali di fornitori terzi.</p> <p>Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati.</p> <p>Aggiornamento agli Operatori Economici correnti.</p> <p>Aggiornamento della sezione <b>Marchi e brevetti</b>.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>