



Rx Only

cobas[®] PIK3CA Mutation Test

In vitro diagnosztikai célra



cobas[®] PIK3CA Mutation Test

24 teszt

P/N: 07003986190

FFPET minták esetén a minta-előkészítést a **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) szerint végezze.

TARTALOMJEGYZÉK

Rendeltetésszerű használat

A teszt összegzése és ismertetése

Háttér	4
Az eljárás alapelvei	5
Referenciaszekvenciák	5
Minta-előkészítés.....	6
PCR-amplifikálás.....	6
A target kiválasztása	6
Targetamplifikálás.....	6
Automatizált valós idejű mutációkimutatás.....	6
Szelektív amplifikálás.....	6

Reagensek és anyagok

A cobas® PIK3CA Mutation Test esetében biztosított reagensek, 24 teszt (P/N: 07003986190).....	7
A reagensek tárolási és kezelési feltételei	8
További szükséges anyagok.....	8
Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek	8

Óvintézkedések és kezelési követelmények

Figyelmeztetések és óvintézkedések.....	9
Helyes laboratóriumi gyakorlat	9
Szennyeződés	9
Felhasználhatóság.....	10
Hulladékkezelés	10
Kiömlés és tisztítás	10
Minta levétele, szállítása és tárolása	10
Mintavétel.....	10
Minták szállítása, tárolása és stabilitása	10
A feldolgozott minták tárolása és stabilitása	11

A teszteljárás

A teszt futtatása.....	11
Használati utasítás	12
Kontrollok a teljes teszthez	12
Amplifikálás és kimutatás	13
A reakció előkészítése	15
Lemez előkészítése	16
PCR indítása.....	16

Eredmények

Eredmények értelmezése	17
Érvénytelen eredményű minták újratestelése	17
Minőség-ellenőrzés és az eredmények érvényessége	18
Mutánskontroll	18
Negatív kontroll	18
Az eljárással kapcsolatos korlátozások	18

A nem klinikai teljesítmény értékelése

A fontosabb teljesítményjellemzők	19
Analitikai érzékenység – blankhatár (LoB)	19
Kimutatási határ FFPET kevert mintáknál	19
Ritka genotípusok detektálása plazmidok segítségével	20
Ismételhetőség	21
Korreláció referencia-módszerrel	21
Keresztreaktivitás	24
Potenciálisan zavaró anyagok értékelése	25

Klinikai teljesítmény értékelése

A klinikai reprodukálhatóság vizsgálata	26
---	----

Eredményjelzők

Eredményjelzők magyarázata	27
----------------------------------	----

További információk

A teszt legfontosabb tulajdonságai	29
Szimbólumok	30
Technikai segítségnyújtás	32
Gyártó és forgalmazók	32
Védjegyek és szabadalmak	32
Szerzői jogok	32
Hivatkozások	33
Dokumentumverzió	34

Rendeltetésszerű használat

A **cobas**® PIK3CA Mutation Test egy valós idejű PCR teszt, amely a foszfoinozítid-3-kináz katalitikus alegységét (PIK3CA) kódoló gén 2-es, 5-ös, 8-as, 10-es és 21-es exonján előforduló 17 mutáció kvalitatív detektálására és azonosítására szolgál formalinfixált, paraffinba ágyazott tumorszövetekből (FFPET) izolált DNS-ben. A **cobas**® PIK3CA Mutation Test egy valós idejű PCR teszt, amely a **cobas**® 4800 rendszeren használatos az olyan áttétes emlőrákos betegek azonosítására, akik daganatában megtalálhatók ezek a mutációk.

A teszt összegzése és ismertetése

Háttér

A foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) szignalizációs útvonala kulcsfontosságú szabályozó szerepet tölt be a normál sejtműködésben, beleértve a növekedésben, túlélésben, motilitásban és proliferációban.¹⁻³ A PI3K útvonal aktiválását és diszregulációját számos humán ráktípusban kimutatták.⁴ A rákos megbetegedésben az útvonal aktiválódásának egyik fontos mechanizmusa a receptor tirozin-kináz (RTK) receptorokon keresztül zajlik, például a humán epidermális növekedési faktor receptor 2-n (HER-2) vagy az epidermális növekedési faktor receptoron (EGFR). A PI3K, Akt és mTOR 3 fő csomóponttal rendelkezik a PI3K/Akt/mTOR szignalizációs útvonalban.⁵ A PI3K útvonal aktiválása miatt a foszfatidinozitol-(4,5)-biszfoszfát (PIP2) átalakul foszfatidinozitol-(3,4,5)-triszfószfáttá (PIP3), amely fontos másodlagos hírvivő, és számos downstream effektorútvonalat stimulál, köztük az Akt-ot és mTOR-t. A PI3K/Akt/mTOR útvonal aktiválása számos sejtes folyamathoz, köztük sejtnövekedéshez, proliferációhoz és túléléshez vezet.⁶

A PIK3CA az egyik legjobban mutálódott onkogén, amelyet a humán daganatokban azonosítottak. Emellett a jelentett mutációk legtöbbje a fehérje néhány „forrópontján” jelentkezik (az alábbi kodonokon: 1047 [40%], 545 [25%] és 542 [13%]).⁷ A legtöbb mutáció elsősorban a PIK3CA 10-es és 21-es exonján történik. Azonban aktiváló mutációkat a 2-es, 5-ös és 8-as exonon is találtak. A *COSMIC* adatbázis szerint a PIK3CA az összes daganattípus 12%-ában mutálódott. Az emlőrákban a vizsgált daganatok 26%-ánál találtak PIK3CA-mutációkat. A PIK3CA-mutációk még gyakoribbnak bizonyultak a hormonreceptor-pozitív (~40%) és a HER-2-pozitív (~25%) emlőrákban.^{8,9}

Nőknél az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált ráktípus, és a rák eredetű elhalálozás vezető oka. 2017-ben világszerte a nőknél előforduló összes rákos eset 25%-a és a rákos elhalálozások 15%-a emlőrák miatt fordul elő.¹⁰ A becslések szerint az emlőrákos esetek fele, az elhalálozások 60%-a a gazdaságilag fejlett országokban történik. Az incidencia aránya általánosságban magas Nyugat- és Észak-Európában, Ausztráliában és Új-Zélandon, valamint Észak-Amerikában. Az incidenciarány világszerte tapasztalt különbségeihez jelentős mértékben hozzájárul a reprodukciós és hormonális tényezők különbsége és a korai detektálás elérhetősége.¹¹ Általánosságban újabb terápiákra van szükség az emlőrák magas incidenciája és az emlőrák miatti halálozás magas esetszáma elleni harcban. A PIK3CA mutációs állapotának ismerete fontos a PIK3CA útvonal aktivitását célzó terápiák alkalmazásánál.

A **cobas**® PIK3CA Mutation Test (**cobas** PIK3CA-teszt) által detektált mutációk felsorolását lásd: 1. táblázat.

1. táblázat: A cobas® PIK3CA-teszt által detektált mutációk

Aktuális PIK3CA exon-szám	Korábbi PIK3CA exon-szám*	PIK3CA mutáció	PIK3CA nukleinsav-szekvencia	HGVS** fehérje megnevezése	HGVS** nukleotid megnevezése	COSMIC azonosító ¹²
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.(His1047Glu)	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.(Gly1049Glu)	NM_006218.2:c.3145G>C	12597
21	20	M1043I	3129G>T	NM_006218.2:p.(Met1043Ile)	NM_006218.2:c.3129G>A	773

* A korábbi PIK3CA exonszámolás nem tartalmazta az első, nem transzlálódó exont

** HGVS – Human Genome Variation Society

Az eljárás alapelvei

A **cobas** PIK3CA-teszt két fő eljárásból épül fel: (1) manuális minta-előkészítés genom DNS izolálására FFPET-ből; és (2) cél DNS PCR-amplifikálása és kimutatása komplementer primerpárok és fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotid-próbák segítségével. A teszt az alábbiak detektálására szolgál: R88Q a 2-es exonon, N345K az 5-ös exonon, C420R a 8-as exonon, E542K, E545X (E545A, E545D*, E545G és E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L és Q546R) a 10-es exonon, valamint M1043I**, H1047X (H1047L, H1047R és H1047Y) és G1049R a 21-es exonon. A mutációk kimutatása PCR-analízissel történik a **cobas z 480** analizátor segítségével. A futtatás érvényességét az biztosítja, hogy minden futtatás tartalmaz egy mutánskontrollt és egy negatív kontrollt.

* Az E545D aminosavcserénél a teszt csak a c.1635G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

** Az M1043I aminosavcserénél a teszt csak a c.3129G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

Referenciaszekvenciák

Tekintse meg a következő forrást a PIK3CA referenciaszekvenciájára vonatkozóan.¹³

PIK3CA: LRG_310t1

Minta-előkészítés

A **cobas**® DNS-minta-előkészítő készlet segítségével FFPET-mintákat lehet feldolgozni és a genomi DNS-t izolálni üvegszálakhoz való nukleinsav-kötődésen alapuló generikus, manuális minta-előkészítéssel. Az FFPET-minta egy deparaffinált 5 µm-es metszetét magas hőmérsékleten inkubálva lizálják egy proteáz- és egy olyan kaotróp lízis-/kötőpuffer segítségével, amely felszabadítja a nukleinsavakat és megvédi a felszabadult genomi DNS-t a DNázoktól. Ezt követően izopropanolt adnak a líziskeverékhez, majd ezt üvegszálás szűrőbetétes oszlopon át centrifugálják. A centrifugálás során a genomi DNS az üvegszálás szűrő felületéhez kötődik. A nem kötődött anyagokat, például sókat, fehérjéket és egyéb sejteredetű szennyeződések a centrifugálás eltávolítja. Az adszorbeált nukleinsavak mosása, majd eluálása vizes oldattal történik. A genomikus DNS mennyiségét spektrofotometriával határozzák meg, és egy adott koncentrációra állítják be, amelyet azután az amplifikációs/kimutatási keverékhez kell adni. Ezt követően a target DNS amplifikálását és kimutatását a **cobas z 480** analizátor végzi a **cobas** PIK3CA-tesztkészletben biztosított amplifikálási és kimutatási reagensek segítségével.

PCR-amplifikálás

A target kiválasztása

A **cobas** PIK3CA-tesztkészlet egy olyan primercsoportot használ, amelyek bizonyos 85–155 bázispár hosszúságú bázispár-szekvenciákat határoznak meg a PIK3CA 2-es, 5-ös, 8-as, 10-es és 21-es exonján. Egy további primerpár egy 167 bázispárból álló konzervatív régiót céloz a PIK3CA gén 4-es exonján, így biztosít kontrollt a teljes teszthez a minta megfelelősége, extrakciója és amplifikálása tekintetében. Az amplifikálás a PIK3CA génnek csak a primerek közötti régiójában zajlik; a teljes PIK3CA gén nem amplifikálódik.

Targetamplifikálás

A targetamplifikálás egy *Thermus* baktériumfaj Z05-AS1 DNS polimerázzsármazékával történik. Először a genomi DNS denaturálása és a primer targetszekvenciák felszabadítása céljából melegíteni kell a PCR reakcióelegyet. Az elegy kihűlésével az upstream és downstream primerek a target DNS-szekvenciákhoz kapcsolódnak. A Z05-AS1 DNS-polimeráz kétértékű fémion és feleslegben levő dNTP-k jelenlétében a kapcsolódott primer folytatásaként egy második DNS-szálat szintetizál. Ezzel a PCR első ciklusa véget ért, létrehozva a PIK3CA gén target bázispár régióit tartalmazó kettős szálú DNS-másolatot. Ez a folyamat számos cikluson keresztül ismétlődik, és az amplikon DNS mennyisége minden ciklus során mintegy kétszeres lesz.

Automatizált valós idejű mutációkimutatás

A **cobas** PIK3CA-teszt valós idejű PCR-technológiát alkalmaz. Minden egyes target-specifikus oligonukleotid próba a reakcióban egy jelzőként szolgáló fluoreszcens festékkel van jelölve, valamint egy blokkoló molekulával, amely az érintetlen próbában elnyeli (blokkolja) a jelölő festék fluoreszcens emisszióját. Az amplifikálás minden egyes ciklusa során egy komplementer próba az amplikon egyszálú DNS-szekvenciájához kötődik, majd az 5'-3'-nukleáz aktivitású Z05-AS1 DNS-polimeráz hasítja. Amikor a jelzőfestéktől a blokkolót a nukleáz-aktivitás elválasztja, akkor a jelzőfesték a megfelelő spektrumú fényel gerjesztve jellemző hullámhosszú fluoreszcens sugárzást bocsát ki, amely mérhető. A PIK3CA targetszekvenciák jelöléséhez a teszt négy különböző jelzőfestéket alkalmaz. A PIK3CA targetszekvencia amplifikálásának kimutatása három egymástól független reakcióban történik a fluoreszcencia négy jellemző hullámhosszon, dedikált optikai csatornában történő mérésével.

Szelektív amplifikálás

A mintában található targetnukleinsav szelektív amplifikálását a **cobas** PIK3CA-teszt az AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim és dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) segítségével hajtja végre.¹⁴ Az AmpErase enzim felismeri és katalizálja a dezoxiuridin tartalmú DNS-szálak megsemmisítését, a timidint tartalmazó DNS-ét viszont nem.

A dezoxiuridin a természetes DNS-ben nincs jelen, ugyanakkor az amplikonokban mindig megtalálható, miután a master mix reagens a nukleotid-trifoszfátok egyikeként deoxitimidin-trifoszfát mellett dUTP-t használ; tehát csak az amplikonok tartalmaznak dezoxiuridint. A dezoxiuridinnak köszönhetően a szennyező amplikont az AmpErase enzim még a target DNS amplifikálását megelőzően lebontja. A master mix reagensben lévő AmpErase enzim katalizálja a dezoxiuridint tartalmazó DNS hasítását a dezoxiuridin-csoportoknál úgy, hogy a dezoxiribózlánc felnyílását okozza a C1 helyen. Az első hevítési lépésben lúgos pH-n az amplikon DNS-lánc eltörik a dezoxiuridin helyén, tehát a DNS nem lesz amplifikálható. Az AmpErase enzim 55 °C felett, azaz a hevítési lépések során inaktív, és így nem bontja le a targetamplikont.

Reagensek és anyagok

Minden felbontatlan reagenst és kontrollt „A reagensek tárolási és kezelési feltételei” táblázat ajánlásai szerint tároljon.

A cobas® PIK3CA Mutation Test esetében biztosított reagensek, 24 teszt (P/N: 07003986190)

Reagensek	Reagens-összetevők	Készletenkénti mennyiség	Biztonsági jelzés és figyelmeztetés
PIK3CA MMX-1 (PIK3CA Master Mix 1; fehér gombos kupak) (P/N 07003897001)	Tris-puffer, kálium-klorid, glicerín, EDTA, nem ionos detergens, dimetil-szulfoxid, 0,09% nátrium-azid, dNTP-k, DNS-polimeráz, AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim (mikrobiális), aptamer, PIK3CA primerek, fluoesczenzen jelölt PIK3CA-próbák	2 × 0,48 ml	N/A
PIK3CA MMX-2 (PIK3CA Master Mix 2; arany gombos kupak) (P/N 07003927001)	Tris-puffer, kálium-klorid, glicerín, EDTA, nem ionos detergens, dimetil-szulfoxid, 0,09% nátrium-azid, dNTP-k, DNS-polimeráz, AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim (mikrobiális), aptamer, PIK3CA primerek, fluoesczenzen jelölt PIK3CA-próbák	2 × 0,48 ml	N/A
PIK3CA MMX-3 (PIK3CA Master Mix 3; zöldeskék gombos kupak) (P/N 07003943001)	Tris-puffer, kálium-klorid, glicerín, EDTA, nem ionos detergens, dimetil-szulfoxid, 0,09% nátrium-azid, dNTP-k, DNS-polimeráz, AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim (mikrobiális), aptamer, PIK3CA primerek, fluoesczenzen jelölt PIK3CA-próbák	2 × 0,48 ml	N/A
MGAC (magnézium-acetát; sárga gombos kupak) (P/N 05854326001)	magnézium-acetát, 0,09% nátrium-azid	6 × 0,20 ml	N/A
PIK3CA MC (PIK3CA mutánskontroll; piros gombos kupak) (P/N 07003960001)	Tris-puffer, EDTA, poli-rA RNS (szintetikus), 0,05% nátrium-azid, a PIK3CA 2-es, 5-ös, 8-as, 10-es és 21-es exonszekvenciákat tartalmazó plazmid DNS, PIK3CA vad típusú DNS	6 × 0,10 ml	N/A
DNA SD (DNS-minta-oldószer) (P/N 05854474001)	Tris-HCl puffer, 0,09% nátrium-azid	2 × 3,5 ml	N/A

A reagenszek tárolási és kezelési feltételei

Reagens	Tárolási hőmérséklet	Tárolási idő
cobas® PIK3CA-mutációteszt*	2–8 °C	Felbontás után 90 napon belül 4 használatig, vagy a jelzett lejárat dátumig stabil (amelyik hamarabb következik).

*A **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** és **MMX** munkareagenst (ami az **MGAC** oldat **PIK3CA MMX-1** vagy **PIK3CA MMX-2** vagy **PIK3CA MMX-3** reagenszekhez való hozzáadásával készül) védeni kell a tartós fényhatástól. Az **MMX** munkareagenst tárolja sötétben 2 °C és 8 °C között. Az előkészített mintákat és kontrollokat az **MMX** munkareagenshez az elkészítésétől számított 1 órán belül adja hozzá. Az amplifikálást a feldolgozott minták és kontrollok Master Mix munkareagenshez adásától számított 1 órán belül meg kell kezdeni.

További szükséges anyagok

Anyagok	P/N
Fehéritőszér	Tetszőleges gyártó
70% etanol	Tetszőleges gyártó
cobas® 4800 System Microwell Plate (AD-lemez) és zárófilm	Roche 05232724001
cobas® 4800 rendszer zárófilm-felhelyező (a cobas® 4800 rendszer telepített része)	Roche 04900383001
Állítható pipetták* (5–1000 µl adagolókapacitással)	Tetszőleges gyártó
Aeroszolbarrieres vagy pozitív kizorításos DNáz-mentes hegyek	Tetszőleges gyártó
Asztali mikrocentrifuga* (20 000 × g kapacitású)	Eppendorf 5430 vagy 5430R, vagy ennek megfelelő
Zárható fedelű mikrocentrifuga-csövek (1,5 ml, steril, RNáz-/DNáz-mentes, PCR minőségű)	Tetszőleges gyártó
Mikrocentrifugacső-állványok	Tetszőleges gyártó
Spektrofotométer a DNS-koncentráció mérésére*	Tetszőleges gyártó
Vortex keverő*	Tetszőleges gyártó
Egyszer használatos kesztyűk, púdermentes	Tetszőleges gyártó

* Valamennyi felszerelés karbantartását a gyártó utasításai szerint kell végezni.

A külön beszerezhető anyagokkal kapcsolatos további információkért forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek

Szükséges, de nem biztosított eszközök és szoftverek	P/N
cobas z 480 analizátor és vezérlőegység	05200881001
cobas® 4800 rendszer alkalmazászoftver (Core) 2.2-es vagy újabb verziója	07565500001
cobas® PIK3CA P1 plazmaanalízis-csomag szoftver, 1.0-ás vagy újabb verziója	08249628001

A külön beszerezhető anyagokkal kapcsolatos további információkért forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

Óvintézkedések és kezelési követelmények

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Mint minden teszteljárásnál, a helyes laboratóriumi gyakorlat alapvető a teszt megfelelő kivitelezéséhez.

- Csak in vitro diagnosztikai célra.
- A biztonsági adatlapok (SDS) igény esetén hozzáférhetőek a helyi Roche irodában.
- Ez a teszt kizárólag FFPET-minták vizsgálatára alkalmas. A mintákat fertőzőként, biztonságos laboratóriumi eljárásokat alkalmazva kell kezelni. Ilyeneket ír le például a Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁵ és a CLSI Document M29-A4.¹⁶
- Steril, egyszer használatos pipetták és DNáz-mentes pipettahegyek használata javasolt.

Helyes laboratóriumi gyakorlat

- Ne pipettázzon szájjal.
- Ne egyen, igyon vagy dohányozzon a laboratórium munkaterületén.
- A minták és reagensek kezelése után alaposan mosson kezet.
- Viseljen szemvédőt, védőruhát és egyszer használatos védőkesztyűt minden reagens kezelése közben. Ezen anyagok bőrrel, szemmel és nyálkahártyával való érintkezése kerülendő. Ha mégis érintkezésbe kerülnek, azonnal öblítse le bő vízzel. Ellenkező esetben égés történhet. Ha reagens ömlik ki, mielőtt feltörölné, hígítsa vízzel.
- Gondosan tisztítson meg, és desztillált vagy ioncserélt vízből frissen készített 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldattal (1:10 arányban hígított háztartási fehérítőszer) fertőtlenítsen minden laboratóriumi munkafelületet. Utána törölje át a felületet 70%-os etanollal.

Megjegyzés: A kereskedelemben kapható folyékony háztartási fehérítő rendszerint 5,25% koncentrációban tartalmaz nátrium-hipokloritot. Az 1:10 arányban hígított háztartási fehérítő 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldatnak felel meg.

Szennyeződés

- Viseljen kesztyűt. A minták és a cobas PIK3CA-teszt reagensének kezelése között a szennyeződés megelőzése érdekében váltson kesztyűt. A minták kezelése során kerülje a kesztyűk szennyezését.
- A minták szennyeződési lehetőségének csökkentése érdekében gyakran cseréljen kesztyűt.
- A DNS-izolációs terület elhagyása előtt vagy ha lehetséges, hogy oldatokhoz vagy mintához ért, cseréljen kesztyűt.
- Kerülje a reagensek mikrobiális szennyezését.
- Az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani az MMX munkareagens elkészítése előtt. Valamennyi művelethez tartozó felszerelést és eszközt jelölni kell, és tilos más művelethez használni vagy más területre átvinni. A DNS-izoláláshoz használt pipettákat és eszközöket például nem szabad az amplifikáláshoz vagy kimutatáshoz használt reagensek előkészítéséhez használni.
- Erősen ajánlott a laboratóriumi folyamatokat egyirányúként szervezni, vagyis egy tevékenység megkezdése előtt az előzőt ajánlatos befejezni. A DNS-izolálást például be kell fejezni az amplifikálás és a kimutatás megkezdése előtt. A DNS-izolálást az amplifikálás és a kimutatás területétől elkülönített helyen kell végezni. Annak érdekében, hogy a Master Mix munkareagens ne szennyeződjön DNS-mintákkal, az amplifikálás és a kimutatás munkaterületét a Master Mix előkészítése előtt alaposan meg kell tisztítani.

Felhasználhatóság

- Ne használja a készleteket a lejáratási idő után.
- Ne öntsön össze különböző készletekből vagy gyártási tételekből származó reagenseket.
- Ne keverje a különböző készlettételekből származó reagenscsöveket.
- Ne használjon egyszer használatos termékeket a lejáratási idő után.
- Az egyszer használatos termékeket csak egyszer szabad felhasználni. Ne használja őket újra.
- Valamennyi felszerelést a gyártó utasításai szerint megfelelően karban kell tartani.

Hulladékkezelés

1. A **MGAC, PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3, PIK3CA MC** és **DNA SD** nátrium-azidot tartalmaz. A nátrium-azid az ólom- és rézcsövekkel reakcióba lépve erősen robbanékony fém-azidokat képezhet. Amikor nátrium-azid tartalmú oldatot önt ki a laboratóriumi mosogatóba, nagy mennyiségű hideg vízzel öblítse a lefolyót az azidlerakódás megakadályozása érdekében.
2. A fel nem használt reagens és hulladék kezelésének összhangban kell lennie a megfelelő országos, szövetségi, állami és helyi előírásokkal.

Kiömlés és tisztítás

- Ha a **cobas® 4800** készülékre folyadék ömlik, a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletének utasításai alapján tisztítsa meg.
- Ne használjon nátrium-hipoklorit-oldatot (fehérítőszert) a **cobas z 480** analizátor tisztításához. A **cobas z 480** analizátort a megfelelő **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében leírt eljárások alapján tisztítsa.
- A **cobas z 480** analizátor fertőzési kockázatának csökkentésére vonatkozó további figyelmeztetéseket, óvintézkedéseket és eljárásokat a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Minta levétele, szállítása és tárolása

Megjegyzés: Valamennyi mintát fertőző anyag átvitelére alkalmasként kell kezelni.

Mintavétel

Az FFPET emlőrák mintákat validálták a **cobas PIK3CA**-teszttel való használathoz.

Minták szállítása, tárolása és stabilitása

Az FFPET emlőrák minták 15 °C és 30 °C között szállíthatók. Az FFPET emlőrák minták szállításának meg kell felelnie az etiológiai ágensek szállítására vonatkozó országos, szövetségi, állami és helyi előírásoknak.¹⁷

Bizonyított, hogy az FFPET emlőrák minták 15 °C és 30 °C között tárolva a mintavétel időpontját követően legfeljebb 12 hónapig stabilak maradnak. A tárgylemezre ragasztott 5 µm-es metszetek 15 °C és 30 °C között legfeljebb 60 napig tárolhatók.

Az FFPET emlőrák minták stabilitási időtartama:

FFPET-mintatípus	FFPET-blokk	5 µm-es FFPET-metszet
FFPET-minta tárolási hőmérséklete	15–30 °C	15–30 °C
Tárolási idő	Legfeljebb 12 hónap	Legfeljebb 60 nap

A feldolgozott minták tárolása és stabilitása

A feldolgozott minták (extrahált DNS) stabil az alábbi körülmények valamelyikének teljesülése esetén:

A kivont DNS tárolási hőmérséklete	–15...–25 °C	2–8 °C	15–30 °C
Tárolási idő	Legfeljebb 3 fagyasztás/olvasztás 60 nap alatt	Legfeljebb 14 nap	Legfeljebb 1 nap

A kivont DNS-t az ajánlott tárolási időtartamon belül kell felhasználni, vagy azon **cobas**® DNS-minta-előkészítő készlet lejáratási dátuma előtt, amellyel a DNS kivonása történt (amelyik hamarabb következik).

A teszteljárás

A teszt futtatása

1. ábra: A cobas PIK3CA-teszt munkafolyamata cobas® DNS-minta-előkészítő készlettel

#	Munkafolyamat lépése
1	A rendszer indítása
2	A készülék karbantartásának elvégzése
3	A minták és reagensek eltávolítása a tárolóból
4	A minták deparaffinálása
5	DNS-izolálás elvégzése
6	DNS-eluálás
7	Munkamenet létrehozása és a lemezelrendezés nyomtatása
8	Az amplifikálási reagensek előkészítése
9	Az amplifikálási reagensek AD-lemezre helyezése
10	A minta AD-lemezre helyezése
11	Az AD-lemez lezárása
12	Az AD-lemez cobas z 480 analizátorra helyezése
13	A futtatás indítása
14	Az eredmények áttekintése
15	LIS esetén: az eredmények LIS-be küldése
16	Az eszközök és anyagok kivétele az analizátorból

Használati utasítás

Megjegyzés: A **cobas** PIK3CA-teszttel csak területenként legalább 10% tumorsejtet tartalmazó, 5 µm vastagságú FFPET emlőrák metszetek használhatók. Területenként 10%-nál kevesebb tumort tartalmazó bármely mintánál deparaffinálás után makrodisszekciót kell végezni.

Megjegyzés: A **cobas z 480** analizátorra vonatkozó részletes használati utasításokat a **cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében** találja.

Futtatási mennyiség

Egyetlen futtatás 96 lyukú AD-lemezenként 1–30 mintát (plusz kontrollokat) tartalmazhat. Amikor 24 mintánál többet futtat, több **cobas** PIK3CA-tesztkészletre lesz szüksége.

A **cobas** PIK3CA-teszt elegendő reagenst tartalmaz 8 futtatáshoz 3 minta (plusz kontrollok) esetén; készletenként legfeljebb 24 mintához.

Kontrollok a teljes teszthez

Ennek a tesztnek a teljes folyamatához negatív kontrollt (**NEG**) kell használni. Minden futtatásban dolgozzon fel egy **NEG**-et a mintával vagy mintákkal együtt a DNS-izolálási eljárástól kezdve.

DNS-izolálás

A DNS izolálását FFPET emlőrák mintából a **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) segítségével kell végezni.

Makrodisszekció

Ha a minta területenként 10%-nál kevesebb tumort tartalmaz, makrodisszekciót kell készíteni a mintán a minta-előkészítés részeként.

DNS mennyiségi meghatározása

Note: A DNS-koncentráció mérését azonnal, még tárolás előtt el kell végezni a DNS-izolálás után.

Note: A DNS-törzsoldatot a **Minták szállítása, tárolása és stabilitása** című részben leírtak szerint tárolja.

1. Vortexelje mindegyik DNS-törzsoldatot 5 másodpercig.
2. Határozza meg a DNS mennyiségét spektrofotométer segítségével a gyártó utasításai szerint. Referenciamintaként a készülékhez használjon DNS-eluáló puffert (**DNA EB**). Két konzisztens leolvasás átlaga szükséges. A két mérésnek $\pm 10\%$ -on belül kell lennie egymáshoz képest, amikor a készülék $\geq 20,0$ ng/µl DNS-koncentrációt jelez. Ha a DNS-koncentráció $< 20,0$ ng/µl, a két mérésnek ± 2 ng/µl-en belül kell lennie. Ha a két mérés nincs $\pm 10\%$ -on belül egymáshoz képest, amikor a DNS-koncentráció leolvasott értéke $\geq 20,0$ ng/µl, vagy ± 2 ng/µl-en belül, amikor a DNS-koncentráció leolvasott értéke $< 20,0$ ng/µl, két további leolvasást kell végezni, amíg a feltételek nem teljesülnek. Utána a két új mérés átlagát kell kiszámítani.

Megjegyzés: A feldolgozott **NEG**-ből származó DNS-törzsoldatot nem szükséges mérni.

3. A mintákból származó DNS-törzsoldat koncentrációjának ≥ 2 ng/µl-nek kell lennie ahhoz, hogy a **cobas** PIK3CA-tesztet el lehessen végezni. Mintánként három amplifikálás/kimutatás történik, minden amplifikálás/kimutatás esetén 25 µl felhasználásával a DNS-törzsoldat 2 ng/µl-es hígításából (összesen 50 ng DNS).

Megjegyzés: A DNS-törzsoldat koncentrációjának minden esetben legalább 2 ng/µl-nek kell lennie ahhoz, hogy a **cobas** PIK3CA-tesztet el lehessen végezni. Ha a DNS-törzsoldat koncentrációja < 2 ng/µl, ismételje meg a deparaffinálás, DNS-izolálás és DNS-mennyiségmeghatározás lépéseit az adott mintára két

5 µm-es FFPET-metszet használatával. Tárgylemezre ragasztott metszetek esetén a deparaffinálást követően tegye ugyanabba a csőbe a két metszetből származó szövetet, merítse a szövetet a DNS szövet lízispuffer (**DNA TLB**) + Proteináz K (**PK**) elegybe, és végezze el a DNS izolálását és mennyiségi meghatározását a fentiek szerint. Tárgylemezre nem ragasztott metszetek esetén tegyen két szövetmetszetet egy csőbe, majd deparaffinálja. Merítse a szövetet **DNA TLB + PK** elegybe, és végezze el a DNS izolálását és mennyiségi meghatározását a fentiek szerint. Ha a DNS-törzsolat még mindig < 2 ng/µl, kérjen másik FFPET-metszetmintát a mintát küldő intézménytől.

Amplifikálás és kimutatás

Megjegyzés: Annak érdekében, hogy az MMX munkareagens DNS-mintával történő szennyeződését elkerülje, az amplifikálást és kimutatást a DNS-izolálástól elkülönített területen kell végezni. Az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani az MMX munkareagens elkészítése előtt. A megfelelő tisztításhoz valamennyi felületet, például az állványokat és pipettákat, gondosan le kell törölni 0,5%-os nátrium-hipoklorit-oldattal, majd 70%-os etanololdattal. A kereskedelemben kapható folyékony háztartási fehérítő rendszerint 5,25% koncentrációban tartalmaz nátrium-hipokloritot. Az 1:10 arányban hígított háztartási fehérítő 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldatnak felel meg.

A készülék előkészítése

A **cobas z 480** analizátor beállítására vonatkozó részletes utasításokat a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Tesztrend összeállítása

A **cobas** PIK3CA-teszt munkafolyamat lépéseinek részletes leírását a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Hozzon létre lemezrendezést a futtatás összes mintája és kontrollja pozíciójával. A mutáns kontroll (MC) a lemez A01–A03 pozícióira kerül. A **NEG** a lemez B01–B03 pozícióira kerül. Utána következnek a hígított minták 3 oszloponként a C01–C03 pozícióktól a H10–H12 pozícióig, az alábbi 2. táblázat szerinti elrendezésben.

2. táblázat: Lemezelrendezés a **cobas** PIK3CA-teszthez

Sor / Oszlop	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	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	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
C	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
D	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
E	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
F	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
G	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
H	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

Ahol: MC = mutánskontroll, NEG = negatív kontroll, S# = mintaazonosító és MMX szám = Master Mix reagens 1, 2 vagy 3.

Megjegyzés: Ahhoz, hogy eredményt kapjon, minden mintát három egymás melletti oszlop azonos sorába kell elosztani.

Megjegyzés: A Master Mix 1 munkareagenst a 01., 04., 07. és 10. oszlopokba kell helyezni a lemezen. A Master Mix 2 munkareagenst a 02., 05., 08. és 11. oszlopokba kell helyezni a lemezen. A Master Mix 3 munkareagenst a 03., 06., 09. és 12. oszlopokba kell helyezni a lemezen.

Megjegyzés: Egy lemezre legfeljebb 30 mintát lehet betölteni. Ha a lemez összes mintájának feldolgozásához egynél több reagenskészletre van szükség, a készleteknek ugyanabból a gyártási tételből kell származniuk.

Minta DNS-törzsoldat hígításának kiszámítása

Hígítás kiszámítása 2–36 ng/μl DNS-törzsoldat-koncentrációk esetén

Megjegyzés: A mintákból származó DNS-törzsoldatokat közvetlenül amplifikálás és kimutatás előtt hígítsa.

Megjegyzés: Mintánként három amplifikálás/kimutatás történik, amihez összesen 75 μl (a három reakció mindegyikéhez 25 μl) szükséges a DNS-törzsoldat 2 ng/μl-es hígításából (összesen 150 ng DNS).

1. Minden mintához számítsa ki a DNS-törzsoldat szükséges térfogatát (μl):

$$\text{A DNS-törzsoldat mennyisége } \mu\text{l-ben} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{DNS-törzsoldat-koncentráció [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Minden mintához számítsa ki a **DNA SD** szükséges mennyiségét (μl):

$$\text{DNA SD mennyisége } \mu\text{l-ben} = 90 \mu\text{l} - \text{a DNS-törzsoldat mennyisége } \mu\text{l-ben}$$

Példa:

$$\text{DNS-törzsoldat koncentrációja} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \text{ A DNS-törzsoldat mennyisége } \mu\text{l-ben} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$$

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

Hígítás kiszámítása, amikor a DNS-törzsoldat-koncentrációk értékei > 36 ng/μl

Megjegyzés: A mintákból származó DNS-törzsoldatokat közvetlenül amplifikálás és kimutatás előtt hígítsa.

Megjegyzés: Mintánként három amplifikálás/kimutatás történik, amihez összesen 75 μl (a három reakció mindegyikéhez 25 μl) szükséges a DNS-törzsoldat 2 ng/μl-es hígításából (összesen 150 ng DNS).

1. Ha a DNS-törzskoncentráció > 36 ng/μl, használja az alábbi képletet a **DNA SD** mennyiségének kiszámításához, amely legalább 90 μl hígított DNS-törzsoldat készítéséhez szükséges. Így biztosítsa, hogy minden mintába legalább 5 μl DNS-törzsoldat kerüljön.

2. Minden mintához számítsa ki a **DNA SD** azon mennyiségét μl-ben, amely 5 μl DNS-törzsoldat 2 ng/μl koncentrációra hígításához szükséges:

$$\text{DNA SD szükséges mennyisége } \mu\text{l-ben} = [(5 \mu\text{l DNS-törzsoldat} \times \text{DNS-törzsoldat-koncentráció (ng}/\mu\text{l)}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Példa:

$$\text{DNS-törzsoldat koncentrációja} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \text{ DNA SD szükséges mennyisége } \mu\text{l-ben} = [(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$$

2. 5 μl DNS-törzsoldat hígításához használja a **DNA SD** kiszámított mennyiségét.

Minták hígítása

1. Készítse elő a kívánt számú 1,5 ml-es zárható fedelű mikrocentrifuga-csövet a DNS hígításhoz, és lássa el a megfelelő mintaazonosítóval.

- Aeroszol-rezisztens hegygel ellátott pipetta segítségével pipettázza a **DNA SD** oldószert kiszámított mennyiségét a megfelelően jelölt csövekbe. Pipettázzon 45 µl **DNA SD**-t egy **NEG** jelölésű zárható fedelű mikrocentrifuga-csőbe.
- Vortexeljen minden egyes DNS-törzsoldatot és a **NEG**-et 5–10 másodpercig.
- Aeroszol-rezisztens pipettahegygel ellátott pipetta segítségével (minden pipettázáshoz új hegygel) óvatosan pipettázza minden egyes DNS-törzsoldat esetén a kiszámított mennyiséget a **DNA SD** oldószert tartalmazó megfelelő csőbe. Pipettázzon 45 µl **NEG**-et (extrahált eluátum) a **NEG** csőbe.
- Helyezze a csövekre a kupakokat, és vortexelje mindegyiket 5–10 másodpercig.
- Cseréljen kesztyűt.

A reakció előkészítése

Master mix (MMX-1, MMX-2 és MMX-3) munkareagensek elkészítése

Megjegyzés: A **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** és az **MMX** munkareagensek fényérzékenyek, és védeni kell a tartós fényhatástól.

Megjegyzés: Mivel a **PIK3CA** reagensek és az **MMX** munkareagens viszkózus folyadékok, lassan pipettázzon, hogy biztosan a teljes mennyiség kijöjjön a hegyből.

Megjegyzés: A **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** és **PIK3CA MMX-3** reagensek színe világoskék/lilás lehet. Ez nem befolyásolja a reagens minőségét.

Készítsen három külön **MMX** munkareagenst: egyet **PIK3CA MMX-1**-ből, egyet **PIK3CA MMX-2**-ből és egy harmadikat **PIK3CA MMX-3**-ből egy-egy 1,5 ml-es zárható fedelű mikrocentrifuga-csőbe.

- Az alábbi képlet alapján számítsa ki az egyes **MMX** munkareagensekhez szükséges **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** vagy **PIK3CA MMX-3** mennyiségét:

$$\text{PIK3CA MMX-1 vagy PIK3CA MMX-2 vagy PIK3CA MMX-3 szükséges mennyisége} = (\text{minták száma} + 2 \text{ kontroll} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

- Az alábbi képlet alapján számítsa ki az egyes **MMX** munkareagensekhez szükséges **MGAC** mennyiségét:

$$\text{MGAC szükséges mennyisége} = (\text{minták száma} + 2 \text{ kontroll} + 1) \times 7 \mu\text{l}$$

A 3. táblázat szerint határozza meg az egyes reagenseknek az **MMX** munkareagens készítéséhez szükséges mennyiségét a futtatásban részt vevő minták száma alapján.

3. táblázat: **MMX-1** munkareagens, **MMX-2** munkareagens és **MMX-3** munkareagens készítéséhez szükséges reagenstérfogatok a vizsgált minták száma* alapján

Reagens	Térfogat	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
-	Össztérfogat az egyes MMX munkareagensekhez (µl)	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

* A minták számához tartozó térfogatok számítása a (minták száma + 2 kontroll + 1) összeg alapján történik

- Vegyen ki 2 °C és 8 °C között tárolt, megfelelő számú **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** vagy **PIK3CA MMX-3** és **MGAC** csövet. Használat előtt vortexelje mindegyik reagenst 5 másodpercig, és gyűjtse a cső aljára a folyadékot. Lásson el jelöléssel steril mikrocentrifuga csöveket az **MMX-1** munkareagens, **MMX-2** munkareagens és **MMX-3** munkareagens számára.

4. Mérje a **PIK3CA MMX-1** vagy **PIK3CA MMX-2** vagy **PIK3CA MMX-3** kiszámított mennyiségét a megfelelő MMX munkareagens-csőbe.
5. Mérje az **MGAC** kiszámított mennyiségét az MMX munkareagens-csővekbe.
6. A megfelelő keveredés érdekében vortexelje a csövet 3–5 másodpercig.

Megjegyzés: *A mintákat és kontrollokat az MMX munkareagensek elkészítésétől számított 1 órán belül az AD-lemezre kell helyezni.*

Megjegyzés: *Csak cobas® 4800 rendszerhez tartozó AD-lemezt és zárófilmet használjon.*

Lemez előkészítése

1. Pipetázzon 25 µl MMX munkareagenst a futtatáshoz szükséges minden reakciólyukba az AD-lemezen. Ügyeljen, hogy a pipetta hegye ne érjen a lemezhez a lyukakon kívül.
 - Mérjen szükség szerint (**PIK3CA MMX-1**-tartalmú) MMX-1 munkareagenst az AD-lemez lyukaiba a 01., 04., 07. és 10. oszlopokban.
 - Mérjen szükség szerint (**PIK3CA MMX-2**-tartalmú) MMX-2 munkareagenst az AD-lemez lyukaiba a 02., 05., 08. és 11. oszlopokban.
 - Mérjen szükség szerint (**PIK3CA MMX-3**-tartalmú) MMX-3 munkareagenst az AD-lemez lyukaiba a 03., 06., 09. és 12. oszlopokban.

2. Pipetázzon 25 µl **PIK3CA MC**-t az AD-lemez **A01**, **A02** és **A03** lyukaiba; legalább kétszeri felszívással és kiürítéssel keverje jól össze a lyukon belül a pipettával.

3. Új pipettaheggyel pipetázzon 25 µl **NEG**-et az AD-lemez **B01**, **B02** és **B03** lyukaiba; legalább kétszeri felszívással és kiürítéssel keverje jól össze a lyukon belül a pipettával.

Megjegyzés: *Minden futtatásnak tartalmaznia kell **PIK3CA MC**-t az **A01**, **A02** és **A03** lyukakban és **NEG**-et a **B01**, **B02** és **B03** lyukakban, különben a futtatást a **cobas z 480** analizátor érvényteleníti.*

Megjegyzés: *Szükség szerint cseréljen kesztyűt, hogy megelőzze a minta–minta átszennyeződést, valamint a PCR reakciócső külső eredetű szennyeződését.*

4. Minden egyes hígított DNS-mintához új pipettahegyet használva mérjen 25 µl-t az első minta-DNS-ből az AD-lemez **C01**, **C02** és **C03** lyukaiba. Használjon új hegyet, valahányszor DNS-mintát tölt a lyukakba, és legalább kétszeri felszívással és kiürítéssel keverje jól össze a lyukon belül a pipettával. Ismételve meg ezt az eljárást az egyes minták hígított DNS-ével, és kövesse az 2. táblázat elrendezését, amíg valamennyi minta hígított DNS-ét be nem töltötte az AD-lemezre. Ellenőrizze, hogy az összes folyadék a lyukak aljára gyűlt-e.

5. Fedje le az AD-lemezt zárófilmmel (a lemezek csomagjából). A zárófilm-felhelyező segítségével rögzítse a filmet szilárdan az AD-lemezre.

6. A PCR indítása előtt ellenőrizze, hogy az összes folyadék az egyes lyukak aljára gyűlt.

Megjegyzés: *Az amplifikálást és kimutatást az első minta DNS-hígításnak az MMX munkaoldathoz hozzáadását követő 1 órán belül meg kell kezdeni.*

PCR indítása

A PIK3CA-munkafolyamat lépéseire vonatkozó részletes utasításokat a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja. Amikor megjelenik a „Select test” előugró ablak, válassza a „PCR Only” munkafolyamat-típust, majd jelölje ki a „PIK3CA P1” lehetőséget, és kattintson az „OK” gombra.

Eredmények

Eredmények értelmezése

Megjegyzés: A futtatások és minták validálását a **cobas® 4800** szoftver végzi.

Megjegyzés: Egy érvényes tesztfuttatás érvényes és érvénytelen mintaeredményeket is tartalmazhat.

A szoftver az érvényes futtatáshoz a minták eredményeit a 4. táblázat szerint értelmezi.

4. táblázat: cobas PIK3CA teszt – eredmények értelmezése

Teszteredmény	Mutációeredmény	Értelmezés
Mutation Detected	R88Q	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	N345K	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	C420R	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	E542K	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	E545X (E545A, E545D*, E545G vagy E545K)	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	Q546X (Q546E, Q546K, Q546L vagy Q546R)	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	M1043I**	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	H1047X (H1047L, H1047R vagy H1047Y)	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	G1049R	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
Mutation Detected	(Egynél több mutáció is jelen lehet)	Kimutatott mutáció az adott target PIK3CA régióban.
No Mutation Detected	N/A	Nincs kimutatható mutáció a target PIK3CA régiókban.
Invalid	N/A	A minta eredménye érvénytelen. Az érvénytelen eredményű minták vizsgálatát ismétlje meg az alábbi „Érvénytelen eredményű minták ismételt tesztelése” című részben írtak szerint.
Failed	N/A	Hibás futtatás hardver- vagy szoftverhiba miatt. Műszaki segítségért vegye fel a kapcsolatot a Roche helyi szervizével.

* Az E545D aminosavcserénél a teszt csak a c.1635G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

** Az M1043I aminosavcserénél a teszt csak a c.3129G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

Megjegyzés: A „No Mutation Detected” eredmény nem zárja ki mutáció jelenlétét a target PIK3CA régiókban, mivel az eredmény a mutáns szekvenciák százalékos arányától, a minta megfelelő integritásától, a gátlóanyagok hiányától és az elegendő mennyiségű kimutatható DNS jelenlététől is függ.

Érvénytelen eredményű minták újratesttelése

1. Ismétlje meg az érvénytelen minta DNS-törzsolatának hígítását az **Amplifikálás és kimutatás** című részben leírt „Minta DNS-törzsolat hígításának kiszámítása” és „Minták hígítása” műveleteitől kezdve.
2. Miután a „Minták hígítása” szakaszban írtak szerint elvégezte a DNS-törzs 2 ng/μl-re hígítását, folytassa a „A Master Mix (MMX-1, MMX-2 és MMX-3) munkareagensek elkészítése” művelettel, valamint az amplifikálás és kimutatás folyamatának többi lépésével.

Megjegyzés: Ha a minta az ismételt teszt után is érvénytelen marad, vagy nem volt elegendő DNS-törzsolat új hígítás készítéséhez az „Érvénytelen eredményű minták ismételt tesztelése” eljárás „A” lépésében, ismétlje meg az adott minta teljes tesztfolyamatát egy új 5 μm-es FFPET-tumormetszettel a „Deparaffinálás” és „DNS-izolálás” lépésektől.

Minőség-ellenőrzés és az eredmények érvényessége

Minden, legfeljebb 30 mintát tartalmazó futtatásban szerepel az MMX-1, MMX-2 és MMX-3 munkareagensekhez tartozó egy készlet **cobas** PIK3CA-teszt **PIK3CA MC** (A01, A02 és A03 lyukak) és egy **NEG** (B01, B02 és B03 lyukak). A futtatás akkor érvényes, ha a **PIK3CA MC** és a **NEG** érvényes. Ha egy **PIK3CA MC** vagy **NEG** érvénytelen, az egész futtatás érvénytelen, és meg kell ismételni. Készítsen egy friss hígítást a korábban izolált minta DNS-törzsoldatból, és állítson össze egy új AD-lemezt kontrollokkal az amplifikáláshoz és kimutatáshoz.

Mutánskontroll

A **PIK3CA MC** eredményének érvényesnek kell lennie („Valid”). Ha a **PIK3CA MC** eredmények következetesen érvénytelenek, technikai segítségért vegye fel a kapcsolatot a Roche helyi kirendeltségével.

Negatív kontroll

A **NEG** eredményének érvényesnek kell lennie („Valid”). Ha a **NEG** eredményei következetesen érvénytelenek, technikai segítségért vegye fel a kapcsolatot a Roche helyi kirendeltségével.

Az eljárással kapcsolatos korlátozások

1. Csak a feltüntetett mintatípusokat tesztelje. A **cobas** PIK3CA-tesztet FFPET emlőrák mintákon validálták.
2. A **cobas** PIK3CA-tesztet csak a **cobas**® DNA Sample Preparation Kit készlettel való használathoz validálták (Roche M/N: 05985536190).
3. Egy mutáció kimutatása a mintában levő kópiák számától függ, és a minta integritása, az izolált DNS mennyisége és a zavaró anyagok jelenléte is befolyásolhatja.
4. A megbízható eredmény a megfelelő mintavétel, szállításon, tároláson és feldolgozáson múlik. Kövesse a **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) használati útmutatójában, az ebben a használati útmutatóban, és a **cobas**® 4800 rendszer felhasználói kézikönyvében ismertetett eljárásokat.
5. Egyéb potenciális változók, például különböző mintafixálási lehetőségek hatását nem vizsgálták.
6. Az AmpErase enzim **cobas** PIK3CA-teszt Master Mixhez adása lehetővé teszi a target DNS szelektív amplifikálását, ugyanakkor a reagensek szennyeződésének elkerüléséhez a helyes laboratóriumi gyakorlat és az ezen használati utasításban meghatározott eljárások gondos betartása szükséges.
7. A terméket csak a PCR-technikák alkalmazására és a **cobas**® 4800 rendszer használatára kiképzett dolgozók használhatják.
8. Csak a **cobas z** 480 analizátort validálták a termékkel való használatra. A termékkel más, valós idejű optikai kimutatással működő PCR-készüléket nem lehet használni.
9. A technológiák különbözősége miatt javasolt, hogy a technológiák váltását megelőzően a felhasználók végezzenek korrelációs laboratóriumi vizsgálatokat, hogy a technológiák közötti különbség minősíthető legyen.
10. PCR-inhibitorok jelenléte álnegatív vagy érvénytelen eredményeket okozhat.
11. Noha ritkán, de a **cobas** PIK3CA-tesztben használt, PIK3CA gén primerek vagy próbál által lefedett DNS-régiójában bekövetkezett mutációk miatt a teszt helytelen eredményeket adhat.
12. Noha ritkán, de a **cobas** PIK3CA-teszt korlátozott keresztreaktivitást („Mutation Detected” eredményt) mutat a 10-es és 21-es exonon lévő célmutációk közelében bekövetkezett mutációk esetén (pl. magas

mutációs százalékok esetén az E545K visszajuthat az E545X;Q546X mutációeredményre vagy a H1047X visszajuthat a H1047X;G1049R mutációeredményre).

13. A **cobas** PIK3CA-tesztet reakciólyukanként 50 ng DNS-sel való használatra validálták. Reakciólyukanként 50 ng-nál kisebb DNS-mennyiség használata nem javasolt.
14. A **cobas** PIK3CA-teszt kvalitatív teszt. A teszt nem alkalmas a mutáció kvantitatív, százalékarányos meghatározására.
15. A degradált DNS-t tartalmazó FFPET emlőrák minták befolyásolhatják a teszt PIK3CA-mutációkimutatási képességét.
16. A „No Mutation Detected” eredményt adó minták rejthetnek a vizsgálat által nem észlelt PIK3CA-mutációkat.
17. Noha ritkán, de az azonos DNS-szálon egymás közelében két mutációt tartalmazó minták esetében zavarás léphet fel a két mutáció egyikének detektálásában (pl. P539R (CCT>CGT) zavarhatja az E542K detektálását, illetve az Y343Y (TAC>TAT) zavarhatja az N345K detektálását).

A nem klinikai teljesítmény értékelése

Megjegyzés: Az alábbi vizsgálatleírások a **cobas** PIK3CA-teszttel végzett vizsgálatok összesített adatait tartalmazzák.

Az alább ismertetett nem klinikai vizsgálatoknál a tumorok százalékarányát patológiai vizsgálattal állapították meg. A tesztelésre a mintákat kétirányú Sanger-féle szekvenálással és új generációs szekvenálással (NGS) választották ki. Az FFPET emlőrák minták mutációjának százalékarányát NGS módszerrel határozták meg.

A fontosabb teljesítményjellemzők

Analitikai érzékenység – blankhatár (LoB)

A **cobas** PIK3CA-teszt teljesítménye meghatározásának céljából, valamint annak biztosítása érdekében, hogy a vad típusú (WT) minta ne váltson ki a mutáció alacsony koncentrációjára utaló analitikai jelet, PIK3CA vad típusú mintákat vizsgáltak FFPET emlőrák mintákban. Az LOB-t a CLSI EP17-A2 irányelvben¹⁸ leírt nem parametrikus opció szerint határozták meg a PIK3CA WT mintákhoz. Az LoB minden mutáció esetében nullának bizonyult.

Kimutatási határ FFPET kevert mintáknál

33, PIK3CA mutációkat tartalmazó FFPET emlőrák szövetmintából izolált DNS-t összekeverték 25, WT PIK3CA FFPET emlőrák szövetmintából izolált DNS-sel, így 42 egyedi DNS-keveréket kaptak a 10,0%, 7,5%, 5,0%, 2,5% és 1,0% mutációs szintet célozva (amelyet NGS-módszerrel határoztak meg). Minden DNS-keverékmintából hígítást készítettek, és minden mutációs szintből 21 ismétlést futtattak le három tétel **cobas** PIK3CA-tesztkészlettel (paneltagonként n = 21). Az egyes minták kimutatási határát a legkisebb olyan százalékos mutációnál határozták meg, amely legalább 95% arányban adott PIK3CA „Mutation Detected” eredményt a target mutációk esetén a 5. táblázat szerint.

5. táblázat: A cobas PIK3CA-teszt kimutatási határa kevert FFPET DNS-mintával

PIK3CA exon	PIK3CA mutáció	PIK3CA nukleinsav-szekvencia	COSMIC azonosító ¹²	Minta	Mutációs százalék abban a paneltagban, amely $\geq 95\%$ arányban „Mutation Detected” eredményt adott reakciólyukanként 50 ng DNS-mennyiség mellett (N = 21 ismétlés)
2	R88Q	263 G>A	746	1. minta	2,2%
2	R88Q	263 G>A	746	2. minta	1,3%
2	R88Q	263 G>A	746	3. minta	1,1%
5	N345K	1035 T>A	754	4. minta	2,2%
5	N345K	1035 T>A	754	5. minta	1,9%
5	N345K	1035 T>A	754	6. minta	1,3%
8	C420R	1258 T>C	757	7. minta	1,7%
8	C420R	1258 T>C	757	8. minta	1,9%
8	C420R	1258 T>C	757	9. minta	1,6%
10	E542K	1624 G>A	760	10. minta	1,1%
10	E542K	1624 G>A	760	11. minta	1,2%
10	E542K	1624 G>A	760	12. minta	1,1%
10	E545A	1634 A>C	12458	13. minta	2,8%
10	E545A	1634 A>C	12458	14. minta	0,9%
10	E545A	1634 A>C	12458	15. minta	1,6%
10	E545G	1634 A>G	764	16. minta	1,8%
10	E545G	1634 A>G	764	17. minta	1,2%
10	E545G	1634 A>G	764	18. minta	1,6%
10	E545K	1633 G>A	763	19. minta	3,3%
10	E545K	1633 G>A	763	20. minta	1,5%
10	E545K	1633 G>A	763	21. minta	1,8%
10	Q546E	1636 C>G	6147	22. minta	3,5%
10	Q546E	1636 C>G	6147	23. minta	1,6%
10	Q546E	1636 C>G	6147	24. minta	2,5%
10	Q546K	1636 C>A	766	25. minta	3,4%
10	Q546K	1636 C>A	766	26. minta	2,3%
10	Q546K	1636 C>A	766	27. minta	2,7%
10	Q546R	1637 A>G	12459	28. minta	1,5%
10	Q546R	1637 A>G	12459	29. minta	3,2%
10	Q546R	1637 A>G	12459	30. minta	1,3%
21	H1047L	3140 A>T	776	31. minta	2,8%
21	H1047L	3140 A>T	776	32. minta	1,8%
21	H1047L	3140 A>T	776	33. minta	3,3%
21	H1047R	3140 A>G	775	34. minta	2,8%
21	H1047R	3140 A>G	775	35. minta	1,5%
21	H1047R	3140 A>G	775	36. minta	1,0%
21	H1047Y	3139 C>T	774	37. minta	3,5%
21	H1047Y	3139 C>T	774	38. minta	2,2%
21	H1047Y	3139 C>T	774	39. minta	3,4%
21	G1049R	3145 G>C	12597	40. minta	1,0%
21	G1049R	3145 G>C	12597	41. minta	0,7%
21	G1049R	3145 G>C	12597	42. minta	1,0%

A cobas PIK3CA-teszt képes volt kimutatni a PIK3CA-génben lévő célmutációkat a 0,7% és 3,5% tartományba eső százalékos mutációval, PCR-enként 50 ng bemeneti DNS-mennyiséggel.

Ritka genotípusok detektálása plazmidok segítségével

A 6. táblázatban feltüntetett három PIK3CA-mutációhoz egy WT DNS-t tartalmazó DNS-plazmidkonstrukció van hozzákeverve alacsony százalékos arányú mutáns DNS-minták elkészítéséhez. Összesen

07004010001-01HU

legalább 20 ismétlésben vizsgálták az egyes plazmidkeverékeket 50 ng bemeneti DNS-mennyiséggel, legalább egy gyártási tétel **cobas** PIK3CA-tesztkészlettel. Az egyes plazmidkeverékeknél érvényes binomiális felső 95%-os konfidenciahatárt a 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat: A **cobas** PIK3CA-tesztel kimutatott mutációk mutáns plazmid DNS-keverékekkel

PIK3CA exon	PIK3CA mutáció	PIK3CA nukleinsav-szekvencia	COSMIC azonosító ¹²	Tényleges százalékos mutáció	Binomiális alsó 95%-os konfidenciahatár (N ≥ 20)	Binomiális felső 95%-os konfidenciahatár (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%

Ismételhetőség

A **cobas** PIK3CA-teszt ismételhetőségét tíz FFPET minta segítségével mérték fel, közöttük két WT mintával, valamint nyolc mutáns mintával, ezek egyenként egy E542K, N345K, E545K, C420R, G1049R, Q546K, R88Q vagy H1047R mutációt tartalmaztak. A mintákat két-két párhuzamos mintaként vizsgálta két vizsgáló két különböző reagenstétellel és két **cobas z** 480 analízátorral nyolc napon keresztül. Mintánként összesen 32 ismétlést értékelték. A **cobas** PIK3CA-teszt 99,7%-os reprodukálhatóságot mutatott (319/320).

Korreláció referencia-módszerrel

206 FFPET emlőrák szövetminta összehasonlító vizsgálatát végezték el a **cobas** PIK3CA-teszt két különböző tételével és Sanger-féle szekvenálással, hogy meghatározzák a módszerek közti pozitív, negatív és teljes megfelelési arányt. A **cobas** PIK3CA-tesztel és a Sanger-féle szekvenálással kapott eltérő eredmények feloldását NGS-módszerrel végezték.

A **cobas** PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer eredményei

A Sanger-módszer és a **cobas** PIK3CA-teszt 205 érvényes eredményének összehasonlítását a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat: A **cobas** PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer eredménye megfelelésének elemzése

	Sanger, MD	Sanger, NMD	Összesen
cobas PIK3CA-teszt, MD	95*	7	102
cobas PIK3CA-teszt, NMD	0	103	103
cobas PIK3CA-teszt, érvénytelen	0	1	1
Összesen	95	111	206

Pozitív megfelelési arány = 100% (95% CI = 96,1–100%)

Negatív megfelelési arány = 93,6% (95% CI = 87,4–96,9%)

Teljes megfelelési arány = 96,6% (95% CI = 93,1–98,3%)

MD: Mutation Detected

NMD: No Mutation Detected

* Az 1. tételből öt minta, a 2. tételből három minta adott MD eredményt mind a Sanger-féle szekvenálással, mind a **cobas** PIK3CA-tesztel, azonban a Sanger-féle szekvenálás kimutatta az első mutációt és nem mutatta ki a második mutációt (lásd 9. táblázat).

A **cobas** PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer összehasonlítása minden egyes minta esetén kilenc targetet értékelt. Összesen 1845 mutáció vizsgálata történt a 205 érvényes minta eredményei alapján. A 8. táblázat bemutatja a **cobas** PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer összehasonlítását a helyes eredmények alapján az 1. tételnél.

8. táblázat: A **cobas**® PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer összehasonlítása az 1. tételnél

	Sanger, R88Q	Sanger, N345K	Sanger, C420R	Sanger, E542K	Sanger, E545X	Sanger, Q546X	Sanger, M1043I	Sanger, H1047X	Sanger, G1049R	Sanger, NMD	Összesen
cobas PIK3CA-teszt, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
cobas PIK3CA-teszt, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
cobas PIK3CA-teszt, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
cobas PIK3CA-teszt, E542K	-	-	-	14	-	-	-	-	-	2	16
cobas PIK3CA-teszt, E545X	-	-	-	-	17	-	-	-	-	2	19
cobas PIK3CA-teszt, Q546X	-	-	-	-	-	8	-	-	-	1*	9
cobas PIK3CA-teszt, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
cobas PIK3CA-teszt, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	42	-	7*	49
cobas PIK3CA-teszt, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
cobas PIK3CA-teszt, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738	1738
cobas PIK3CA-teszt, érvénytelen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Összesen	1	7	3	14	17	8	0	42	3	1759	1854

* A 2. tétel eredményei hasonlóak voltak, mint az 1. tétel eredményei, kivéve hogy összesen kettővel kevesebb eltérő eredmény született a 2. tétel esetében. Lásd a 9. táblázat 8. mintáját és 9. mintáját.

Eltérő eredmények vizsgálata NGS-módszerrel

Hét minta mutációeredménye volt eltérő a Sanger-féle szekvenálás és a **cobas** PIK3CA-teszt szerint. További öt minta mutatott egyezést egy mutáció esetében, azonban a **cobas** PIK3CA-teszt mindegyiknél egy további mutációt detektált. Ezt a tizenkét mintát elemezték NGS-módszerrel, és a 9. táblázat mutatja be. Egy felülvizsgált egyezési elemzést végeztek az NGS-elemzés eredményei alapján. Ebben a vizsgálatban a **cobas** PIK3CA-teszt eredményével megegyező NGS-eredményt adó mintákat „megegyezőnek” tekintették.

9. táblázat: Nem egyező eredmények feloldása NGS-módszerrel

Minta	Sanger	cobas PIK3CA-teszt, 1. tétel	NGS-feloldás, 1. tétel**	cobas PIK3CA-teszt, 2. tétel	NGS-feloldás, 2. tétel**
1. minta	NMD	H1047X	H1047R (3,4% mutáció)	H1047X	H1047R (2,5% mutáció)
2. minta	NMD	E542K	E542K (4,8% mutáció)	E542K	E542K (3,4% mutáció)
3. minta	NMD	H1047X	H1047R (2,0% mutáció)	H1047X	H1047R (2,8% mutáció)
4. minta	NMD	E542K	E542K (10,1% mutáció)	E542K	E542K (8,3% mutáció)

Minta	Sanger	cobas PIK3CA-teszt, 1. tétel	NGS-feloldás, 1. tétel**	cobas PIK3CA-teszt, 2. tétel	NGS-feloldás, 2. tétel**
5. minta	NMD	E545X	E545K (4,3% mutáció)	E545X	E545K (2,2% mutáció)
6. minta	NMD	H1047X	H1047R (5,1% mutáció); H1047Y (1,1% mutáció)	H1047X	H1047R (4,1% mutáció)
7. minta	NMD	E545X	E545K (17,2% mutáció)	E545X	E545K (25,6% mutáció)
8. minta*	H1047L	H1047X;Q546X	Q546K (2,2% mutáció)	H1047X	N/A
9. minta*	Q546R	H1047X;Q546X	H1047R (0,6% mutáció); H1047Y (0,4% mutáció)	Q546X	N/A
10. minta	C420R	H1047X;C420R	H1047R (0,9% mutáció)	H1047X;C420R	H1047R (1,1% mutáció)
11. minta	E545K	H1047X;E545X	H1047R (1,7% mutáció)	H1047X;E545X	H1047R (1,8% mutáció)
12. minta	Q546E	H1047X;Q546X	H1047R (6,7% mutáció)	H1047X;Q546X	H1047R (5,4% mutáció)

* A 8. és 9. minta nem adott megegyező eredményt az 1. tétel és a 2. tétel használatával. A 2. tétel eredménye megegyezett a Sanger-módszer eredményével, így nem volt szükség tesztelésre az ellentmondás feloldásához.

** Csak az ellentmondó eredményt adó exon(ok)nál végeztek NGS-t az ellentmondás feloldásához.

Megjegyzés: A 8–12. minta **cobas PIK3CA-teszteredménye kimutatta ugyanazokat a PIK3CA-mutációkat, mint a Sanger-módszer, azonban az NGS további mutációkat is kimutatott és igazolt.**

A **cobas PIK3CA-teszt** és a Sanger-módszer ellentmondó eredményeit NGS-módszerrel oldották fel, a **cobas PIK3CA-teszt** teljes egyezése a szekvenálással 100% volt az összes célmutáció esetében minden egyes gyártási tételnél, amint a 10. táblázat mutatja.

10. táblázat: A cobas PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer megfelelésének vizsgálata, az ellentmondó eredmények feloldása NGS-sel történt (Sanger + NGS)

	Sanger+NGS, MD	Sanger+NGS, NMD	Összesen
cobas PIK3CA-teszt, MD	102	0	102
cobas PIK3CA-teszt, NMD	0	103	103
cobas PIK3CA-teszt, érvénytelen	0	1	1
Összesen	102	104	206

Pozitív megfelelési arány = 100% (95% CI = 96,4–100%)

Negatív megfelelési arány = 100% (95% CI = 96,4–100%)

Teljes megfelelési arány = 100% (95% CI = 98,2–100%)

A 11. táblázat bemutatja a **cobas** PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer összehasonlítását a helyes eredmények alapján (az ellentmondó eredményeket NGS-sel oldották fel) az 1. tételnél.

11. táblázat: A cobas PIK3CA-teszt és a Sanger-módszer által kapott helyes eredmények szerinti összehasonlítása, az ellentmondó eredmények feloldása NGS-sel történt (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	Összesen
cobas PIK3CA-teszt, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
cobas PIK3CA-teszt, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
cobas PIK3CA-teszt, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
cobas PIK3CA-teszt, E542K	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	16
cobas PIK3CA-teszt, E545X	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19
cobas PIK3CA-teszt, Q546X	-	-	-	-	-	9*	-	-	-	-	9
cobas PIK3CA-teszt, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
cobas PIK3CA-teszt, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	49*	-	-	49
cobas PIK3CA-teszt, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
cobas PIK3CA-teszt, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738*	1738
cobas PIK3CA-teszt, érvénytelen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Összesen	1	7	3	16	19	9	0	49	3	1747	1854

* A 2. tétel eredményei hasonlóak voltak, mint az 1. tétel eredményei, kivéve hogy összesen kettővel kevesebb mutációt ismert fel a cobas PIK3CA-teszt és a Sanger + NGS. Lásd a 9. táblázat 8. mintáját és 9. mintáját. A 2. tétel eredményében kettővel több NMD, és ennek megfelelően eggyel kevesebb Q546X-mutáció és eggyel kevesebb H1047X-mutáció volt.

Keresztreaktivitás

Az alábbi, nem célzott mutációkat vizsgálták keresztreaktivitás szempontjából plazmidok segítségével, körülbelül 50% plazmival a genomi DNS bemeneti mennyiségében: M1043I, M1043V, M1043T, G1049S, G1049A, E542V, E542Q, E545D, E545V, E545Q, Q546P, Q546H és a PIK3CA pszeudogén. Ezek a nem célzott mutációk nem keresztreakáltak (nem zavarták) a **cobas** PIK3CA-tesztet, amikor WT és mutáns PIK3CA-szekvenciákhoz adták azokat.

Potenciálisan zavaró anyagok értékelése

Endogén

Trigliceridek (≤ 37 mM, CLSI által javasolt magas koncentráció¹⁹) és hemoglobin (≤ 2 mg/ml, CLSI által javasolt magas koncentráció¹⁹) nem mutattak zavaró hatást a **cobas** PIK3CA-teszt során, amikor az anyagot a minta-előkészítés folyamán a mintához adták. Emellett a legfeljebb 90% zsírszövetet tartalmazó minták vizsgálatakor azok nem mutattak zavaró hatást a **cobas** PIK3CA-teszt során.

Exogén

Az alábbi hatóanyagok zavaró hatását vizsgálták 3-szoros C_{max} -értéknél: letrozol, anasztrozol, kapecitabin, tamoxifén, exemesztán, everolimusz, paklitaxel, docetaxel, ciklofoszfamid, doxorubicin és fulvesztrant. Ezen hatóanyagok esetében nem tapasztaltak zavaró hatást a **cobas** PIK3CA-tesztnél, amikor a minta-előkészítési eljárás során hozzáadták ezen hatóanyagokat a mintákhoz.

Nekrotikus szövet

A PIK3CA-mutáns minták esetén legfeljebb 55%, WT minták esetén legfeljebb 70% nekrotikus szövetet tartalmazó FFPET emlőrák szövetminták nem mutattak zavaró hatást a **cobas** PIK3CA-teszt eredményeire.

Klinikai teljesítmény értékelése

A klinikai reprodukálhatóság vizsgálata

A **cobas** PIK3CA-teszt reprodukálhatóságának felmérése céljából vizsgálatot végeztek 3 vizsgálóhelyen (1 belső és 2 külső; helyszínenként 2 vizsgálóval) 3 reagenstétellel 5 nem egymást követő napon át vad típusú (WT) és mutáns típusú (MT) tumorminták FFPET szövetmetszetéből származó DNS-minták 21 tagú paneljével, amelyek kereskedelmi célú szövetbankokból származnak. Ez a panel a 2-es, 5-ös, 8-as, 10-es és 21-es exonokon tartalmazott mutációkat, amit DNS-szekvenálással igazoltak. A 21 paneltagon 90 érvényes futtatással összesen 3780 tesztet végeztek el, és minden teszteredmény érvényes volt. A WT-paneltagok 180 érvényes vizsgálatának eredménye „No Mutation Detected” volt, ami 100%-os megfelelést jelent. A 20 MT-paneltag közül 19 esetében 100% volt a megfelelés. A 10-es exon E545 – LoD paneltag esetén a megfelelés 99,4% volt (180-ból 179 teszt volt „Mutation Detected” eredményű). A teljes megfelelési arány szerinti eredményeket a 12 tartalmazza. A variációs koefficiens (CV) az összes mutációs paneltag esetében < 2% volt. Belső kontrollra a teljes CV < 1,9% volt. A CV% < 0,4% volt a tételek között és < 1,9% tételen belül.

12. táblázat: Megfelelések összesített becslése paneltagonként a reprodukálhatósági vizsgálatban

Paneltag	Érvényes vizsgálatok száma	Megfelelés N	Megfelelés % (95% CI) ^a
Vad típus	180	180	100 (98,0, 100,0)
5-ös exon N345K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E542K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E545K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon H1047L – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon G1049R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
5-ös exon N345K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E542K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E545K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon H1047L – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon G1049R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
2-es exon R88Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
8-as exon C420R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E545A – LoD	180	179	99,4 (96,9, 100,0)
10-es exon Q546K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon H1047R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
2-es exon R88Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
8-as exon C420R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon E545A – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
10-es exon Q546K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21-es exon H1047R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Megjegyzés: Amikor a mutáns paneltag érvényes tesztje „Mutation Detected” eredményt adott, illetve amikor a vad típusú paneltag érvényes „No Mutation Detected” eredményt adott, az eredményeket megfelelésként tüntettük fel.

^a 95% CI = 95% egzakt binomiális konfidenciaintervallum.

Összefoglalva, a **cobas** PIK3CA-teszt reprodukálhatósága a formalinfixált, paraffinba ágyazott humán emlőrák szövetmintákból származó DNS PIK3CA-génjének 2-es, 5-ös, 8-as, 10-es és 21-es exonja mutációinak azonosításában kiváló volt, és a vizsgálatban minden értékelt mutáció esetében > 99%-os egyezést mutatott.

Eredményjelzők

Eredményjelzők magyarázata

A jelzők forrását a jelzők kódja mutatja a 13. táblázat szerint.

13. táblázat: Jelző forrása

A jelzőkód első betűje	Jelző forrása	Példa
M*	Több vagy egyéb ok	M6
R	Az eredmény értelmezése	R500
Z*	Analizátor	Z1

* További információkat **cobas**® 4800 rendszer felhasználói segédletében talál.

A 14. táblázat a rendszer összes olyan eredményjelzőjét felsorolja, amellyel a felhasználó találkozhat.

14. táblázat: Eredményértelmezési jelzők listája

Jelzőkód	Leírás	Javasolt teendő
R500–R511	Nem kimutatható mutánskontroll	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmeghatározó algoritmus hibát tapasztalt. Ez atipikus vagy zajos fluoreszcenciamintázatok esetén fordulhat elő.
R512–R523	Nem kimutatható mutánskontroll	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelentik, hogy a mutánskontroll negatív eredményt adott (vagyis előfordulhat, hogy egy vagy több lyukba nem került mutánskontroll DNS).
R524–R535	A mutánskontroll a tartományon kívül van	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a mutánskontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez DNS-szennyeződés esetén fordulhat elő.
R536–R547	A mutánskontroll a tartományon kívül van	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a mutánskontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték felett volt (azaz a könyök túl magas). Ez a következők esetén fordulhat elő: 1. A Master Mix munkareagens hibás elkészítése, 2. Pipettázási hiba a Master Mix munkareagensnek az AD-lemez egyik reakciólyukába adagolásakor, illetve 3. Pipettázási hiba a mutánskontrollnak az AD-lemez egyik reakciólyukába adagolásakor.
R548–R559	Nem kimutatható negatív kontroll	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmeghatározó algoritmus hibát tapasztalt. Ez atipikus vagy zajos fluoreszcenciamintázatok esetén fordulhat elő.
R560–R571	A negatív kontroll a tartományon kívül van	Ismételje meg a futtatást. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a negatív kontroll esetében pozitív eredmény jelentkezett (azaz szennyeződési esemény történt).

Jelzőkód	Leírás	Javasolt teendő
R572-R583	Nem kimutatható target	Ismételje meg a mintát. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a könyökmeghatározó algoritmus hibát tapasztalt. Ez atipikus vagy zajos fluoreszcenciamentázatok esetén fordulhat elő.
R584–R586, R588–R590, R592–R594, R596–R604	Az eredmény a tartományon kívül van	Ismételje meg a mintát. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok az alábbiak valamelyikét jelzik: 1. Atipikusan alacsony könyökérték volt megfigyelhető a mintánál, illetve 2. Atipikus kapcsolat van a mutáns könyökértéke és a belső kontroll könyökértéke között az adott mintánál.
R587, R591, R595	A belső kontroll a tartományon kívül van	Ismételje meg a mintát. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelzik, hogy a rendszer mintával kapcsolatos atipikusan alacsony könyökértéket észlelt a belső kontrollnál. Ez akkor fordulhat elő, ha a PCR-keverékben szignifikánsan sok a koncentrált genomi DNS.
R605–R610	Nem kimutatható belső kontroll	Ismételje meg a mintát. Lásd A teszteljárás rész. Ezek a jelzőkódok azt jelentik, hogy a minta belső kontroll eredménye nem volt érvényes. Az érvényes belső kontroll eredmény hiánya a következőkre utal: 1. Rossz minőségű genomi DNS a mintában, 2. Elégtelen mintafeldolgozás, 3. PCR-inhibitorok jelenléte a mintában, 4. Ritka mutációk a belső kontroll primerjei és/vagy próbái által lefedett genomi DNS régióiban, 5. Egy vagy több lyukba esetleg nem adagoltak minta-DNS-t, illetve 6. Egyéb tényezők.

További információk

A teszt legfontosabb tulajdonságai

Mintatípus	Formalinfixált, paraffinba ágyazott szövet (FFPET)
Minimálisan szükséges mintamennyiség	5 µm-es FFPET-metszet
Analitikai érzékenység	5% mutáns szekvencia 50 ng DNS-ben
Analitikai specifitás	100% egyezés a szekvenálással R88Q N345K C420R E542K
Kimutatott genotípusok	E545X (E545A, E545D*, E545G vagy E545K) Q546X (Q546E, Q546K, Q546L vagy Q546R) M1043I** H1047X (H1047L, H1047R vagy H1047Y) G1049R





























* Az E545D aminosavcserénél a teszt csak a c.1635G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

** Az M1043I aminosavcserénél a teszt csak a c.3129G>T mutációs nukleotidváltozást ismeri fel.

Szimbólumok

A Roche PCR diagnosztikai termékeket a következő szimbólumok jelölik.

15. táblázat: A Roche PCR diagnosztikai termékek címkéjén használt szimbólumok

 Age/DOB	Életkor vagy születési idő		Gyártás napja
	Segédsoftver		Forgalmazó
	Megadott tartomány (kópia/ml)		Tilos újrafelhasználni
	Megadott tartomány (IU/ml)		Nő
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben		Csak IVD teljesítmény értékelésre
	Vonalkód-adatlap		Globális kereskedelmi cikkszám
	Mintacsoport száma		<i>In vitro</i> diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Biológiai veszély		Megadott tartomány alsó határa
	Katalógusszám		Férfi
	Gyűjtés dátuma		Gyártó
	Olvassa el a használati útmutatót		Negatív kontroll
	Tartalma <n> vizsgálathoz elegendő		Nem steril
	A készlet tartalma		Beteg száma
	Kontroll		Beteg neve



Itt húzza le



Ezzel a részével felfelé

CONTROL +

Pozitív kontroll

UDI

Egyedi eszközazonosító

QS copies / PCR

QS-kópiák száma PCR-reakciónként; használja a QS-kópiák reakciónkénti számát az eredmények számításához.

Procedure UltraSensitive

Ultraérzékeny eljárás

QS IU/PCR

QS-IU-k száma PCR-reakciónként; használja a QS-IU-k (nemzetközi egységek) reakciónkénti számát az eredmények számításához.

ULR

Meadott tartomány felső határa

Urine Fill Line

Vizelet töltővonala

SN

Sorozatszám

Rx Only

Csak az USA-ban: Az USA szövetségi törvényei értelmében az eszköz csak orvos részére vagy rendelvényére adható ki.

Site

Hely



Lejárat dátuma

Procedure Standard

Szokásos eljárás



Beteg melletti teszteszetre szolgáló eszköz

STERILE EO

Etilén-oxiddal sterilizálva



Nem a beteg melletti teszteszetre szolgáló eszköz



Sötétben tárolandó



Önteszteszetre szolgáló eszköz



Hőmérsékletkorlát



Nem önteszteszetre szolgáló eszköz



Vizsgálatdefiníciós fájl

CEMegfelelőségi CE-jelölés: ez az eszköz megfelel az *in vitro* diagnosztikai orvostechnikai eszközök CE-jelölésére vonatkozó előírásoknak

Technikai segítségnyújtás

Technikai segítségnyújtásért (támogatásért), kérjük, forduljon a területileg illetékes leányvállalatunkhoz:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Gyártó és forgalmazók

16. táblázat: Gyártó és forgalmazók



Készült az Amerikai Egyesült
Államokban

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



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(Műszaki támogatásért kérjük,
hívja a Roche Response Center
ingyenesen hívható telefonszámát:
1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Védjegyek és szabadalmak

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

Szerzői jogok

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Hivatkozások

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. 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. 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.

Dokumentumverzió

Dokumentum verzióinformációi	
Doc Rev. 1.0 09/2020	Első közzététel.