

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test



IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLRA.

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

A minta-előkészítéssel kapcsolatos tudnivalókat a **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (DNS minta-előkészítő készlet; M/N 05985536190) dokumentációja tartalmazza.

RENDELTESSZERŰ HASZNÁLAT

A **cobas®** 4800 BRAF V600 mutáció teszt elsődleges felhasználása a BRAF V600 mutációk kimutatása formalin-fixált, paraffinba ágyazott humán melanoma-, illetve papillaris pajzsmirigy-carcinoma (*Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) szövetből extrahált DNS-ben. Melanoma érintettség esetén segédeszközként használható azon betegek kiválasztására, akiknek tumora BRAF V600 mutációt hordoz, és a kezelésük vagy csak ZELBORAF® (vemurafenib) gyógyszerrel, vagy COTELLIC® (cobimetinib) és ZELBORAF® (vemurafenib) kombinációjával történik.

A VIZSGÁLAT ÖSSZEGZÉSE ÉS MAGYARÁZATA

A BRAF protoonkogén aktiváló mutációi számos humán rákban előfordulnak, egyebek között malignus melanomában, colorectalis rákban, petefészekrákban és pajzsmirigyrákban.^{1,2} A malignus melanomák 40–60%-ában azonosítottak BRAF mutációkat,³ valamint a papillaris pajzsmirigy-carcinomák 36–46%-ában is.^{4,5} BRAF mutációk benignus anyajegyekben szintén gyakoriak,⁶ így felmerül, hogy az ilyen mutációk igen korai eseménynek számítanak. A BRAF gén ilyen, melanomában, PTC-ben és más humán daganatokban előforduló szomatikus mutációinak felfedezése elősegítette a BRAF kináz központi szerepének tisztázását a sejtprolifерációt, -differenciálódást és sejthalált szabályozó jelátviteli utakban. Normál sejtekben a BRAF egy szigorúan szabályozott jelátviteli út része, amely a növekedési faktor receptorok (pl. EGFR) hatását mediálja RAS, RAF, MEK és ERK komponenseken keresztül. A BRAF onkogén mutációi egy kinázfunkció létrejöttét eredményezik, amelynek következtében a RAF-MEK-ERK út konstitutívan aktívvá válik a típusos növekedési faktorok hiányában is.

A BRAF mutációk túlnyomó többsége melanomában, PTC-ben és más humán daganatokban a 600. kodonban fordul elő.⁷ A 600. kodon predomináns mutációja a V600E mutáció (GTG > GAG). A 600. kodont érintő számos kevésbé gyakori dinukleotid mutációt [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) és V600D (GTG > GAT)] ugyancsak megfigyelték, elsősorban melanomában és ritkábban egyéb daganatokban, pl. colorectalis rákban.

A **cobas®** 4800 BRAF V600 mutációteszt valós idejű PCR-vizsgálat, amelyet a V600E (T1799A) mutáció kimutatására terveztek. A **cobas®** 4800 BRAF V600 mutációteszt kiegészítő diagnosztikai teszt a vemurafenib vegyületre, amely gátolja a BRAF mutáns V600E változatát. Az előrehaladott melanomában szenvedő betegek klinikai vizsgálatai szerint a V600E-mutáns tumorú betegek esetében valószínűleg klinikai előnyökkel jár a vegyület használata.^{8,9} Az előrehaladott melanomában szenvedő betegek körében végzett klinikai vizsgálat a cobimetinib és vemurafenib együttes használatáról megmutatta, hogy az olyan betegeknél, akiknek a **cobas®** 4800 BRAF V600 mutációteszt által kimutatott V600E vagy V600K-mutáns tumoruk van, valószínűleg klinikai előnyökkel jár a vegyület használata.^{10,11} A V600K a BRAF V600 mutációt tartalmazó melanomaminták mintegy 10–15%-ánál van jelen.¹²

AZ ELJÁRÁS ALAPELVEI

A **cobas®** 4800 BRAF V600 mutációteszt (**cobas** BRAF teszt) két eljárás alapján: (1) manuális minta-előkészítés genomiális DNS izolálására formalinfixált, paraffinba ágyazott szövetből (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue* – FFPE); és (2) a cél DNS PCR-amplifikálása és kimutatása komplementer primerpár és különböző fluoreszcens festékkel jelölt két oligonukleotid-próba segítségével. Egyik próbát a vad típusú BRAF V600 szekvencia, a másik próbát pedig a V600E mutációs szekvencia kimutatására tervezték. A készlethez két külső futtatási kontroll tartozik, és a vad típusú allél belső, teljes folyamat kontrollként szolgál.

Minta előkészítése

A **cobas®** DNA Sample Preparation Kit segítségével FFPE-szövetmintákat lehet feldolgozni és a genomiális DNS-t izolálni üvegszálakhoz való nukleinsav-kötődésen alapuló manuális minta-előkészítéssel. Az FFPE-szövetminta egy deparaffinált 5 µm-es metszetét magas hőmérsékleten inkubálva lizálják egy proteáz- és egy olyan chaotrop lízis-/kötőpuffer segítségével, amely felszabadítja a nukleinsavakat, és megvédi a felszabadult genomi DNS-t a DNázoktól. Ezt követően izopropanolt adnak a líziskeverékhez, majd ezt üvegszálak szűrőbetétes oszlopon át centrifugálják. A centrifugálás során a genomi DNS az üvegszálak 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 genomiális DNS mennyiségét spektrofotometriával határozzák meg, és egy adott koncentrációra állítják be, amelyet azután az amplifikáló- és kimutatókeverékhez kell adni. Ezt követően a target DNS amplifikálását és kimutatását a **cobas z 480** analízátor végzi a **cobas** BRAF tesztkészletben biztosított amplifikálási és kimutató reagens segítségével.

PCR amplifikálás és kimutatás

A target kiválasztása

A **cobas** BRAF teszt olyan primereket használ, amelyek a 15-ös exonon a BRAF 600-as kodon helyét tartalmazó humán genomiális DNS egy 116 bázispárból álló szekvenciáját határozzák meg. A teszt nem amplifikálja a teljes BRAF gént. A **cobas** BRAF tesztet az 1799 T>A nukleotidcsere kimutatására tervezték a BRAF génben, amely a 600-as kodonnál való glutaminsav szubsztitúciót eredményez (V600E). A BRAF vad típus és mutáns DNS targetspecifikus fluoreszcens festékkel jelölt TaqMan próbák a vad típusú, illetve a mutáns szekvenciákhoz kötődnek. A vad típusú és mutáns szekvenciákat az adott szekvenciához rendelt optikai csatorna detektálja.

Targetamplifikálás

Thermus species Z05 DNS polimerázt alkalmaz a rendszer a targetamplifikáláshoz. Először a genomi DNS denaturálása és a primer targetszekvenciák felszabadítása végett a PCR reakcióelegyet fel kell melegíteni. Az elegy kihűlésével az upstream és downstream primerek a target DNS-szekvenciákhoz kapcsolódnak. A Z05 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, a BRAF gén 116 bázispár hosszú targetrégiójának egy kettős szálú DNS-másolatát létrehozva. Ez a folyamat számos cikluson keresztül ismétlődik, és az amplikon DNS mennyisége minden ciklus során megduplázódik. Az amplifikálás csak a BRAF gén primerek közötti régiójában zajlik.

Automatizált valós idejű kimutatás

A **cobas** BRAF-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 a komplementer próba az amplikon egyszálú DNS-szekvenciájához kötődik, majd az 5'-3'-nukleázaktivitású Z05 DNS-polimeráz hasítja. Amikor a jelzőfestéktől a blokkolót a nukleáz-aktivitás elválasztja, akkor a jelzőfesték a megfelelő spektrumú fénnel gerjesztve jellemző hullámhosszú fluoreszcens sugárzást bocsát ki, amely mérhető. A target-specifikus BRAF vad típusú (WT) próba és a BRAF V600E mutációs próba jelöléséhez a teszt két különböző jelzőfestéket alkalmaz. A két BRAF szekvencia amplifikálása egyetlen reakciólyukban egymástól függetlenül detektálható a fluoreszcencia kijelölt optikai csatornában, két jellemző hullámhosszon történő mérésével.

Szelektív amplifikálás

A mintában lévő targetnukleinsav szelektív amplifikálását a **cobas** BRAF teszt az AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim és dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) használatával hajtja végre.¹³ Az AmpErase enzim felismeri és katalizálja a dezoxiuridin-tartalmú DNS-szálak megsemmisítését, a timidint tartalmazó DNS-et viszont nem. A dezoxiuridin a természetes DNS-ben nincs jelen, ugyanakkor az amplikonokban mindig megtalálható, miután a reakciómix reagens a nukleotid-trifoszfátok egyikeként dUTP-t használ; tehát csak az amplikonok tartalmazzak dezoxiuridint. A dezoxiuridinnak köszönhetően a szennyező amplikont az AmpErase enzim még a target DNS amplifikálását megelőzően lebontja. A Reaction Mix reagensben lévő AmpErase enzim katalizálja a dezoxiuridint tartalmazó DNS hasítását a dezoxiuridin-maradványoknál a dezoxiribózlánc felnyitásával 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, azaz nem bontja le a targetamplikont.

REAGENSEK

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 teszt (M/N: 05985595190)			
A készlet összetevői	Reagensösszetevők	Készletenkénti mennyiség	Biztonsági jelzés és figyelmeztetés ^a
RXNMIX (reakciómix)	Tricin puffer Kálium-acetát Kálium-hidroxid Glicerín Tween 20 EDTA 5% dimetil-szulfoxid < 0,09% dNTP-k < 0,10% Z05 DNS-polimeráz (mikrobiális) < 0,10% AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim (mikrobiális) < 0,003% oligonukleotid aptamer 0,08% nátrium-azid	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (magnézium-acetát)	magnézium-acetát 0,09% nátrium-azid	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (BRAF oligo mix)	tris-HCl puffer EDTA 0,09% nátrium-azid poli-rA RNS (szintetikus) < 0,01% upstream és downstream BRAF primerek < 0,01% fluoreszcensen jelölt BRAF próbák	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (BRAF mutáns kontroll)	tris-HCl puffer EDTA poli-rA RNS (szintetikus) 0,05% nátrium-azid < 0,001% plazmid DNS (mikrobiális), amely BRAF mutáns szekvenciát tartalmaz < 0,001% plazmid DNS (mikrobiális), amely BRAF vad típus szekvenciát tartalmaz	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (BRAF vad típus kontroll)	tris-HCl puffer EDTA poli-rA RNS (szintetikus) 0,05% nátrium-azid < 0,001% plazmid DNS (mikrobiális), amely BRAF vad típus szekvenciát tartalmaz	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (DNS mintaoldószer)	tris-HCl puffer 0,09% nátrium-azid	2 × 1 ml	N/A

^a A termék biztonsági címkéi megfelelnek az EU GHS előírásainak.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

A. *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLRA.

- B. A teszt formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetminták vizsgálatára szolgál.
- C. Ne pipettázzon szájjal.
- D. Ne egyen, igyon vagy dohányozzon a laboratórium munkaterületén.
- E. Kerülje a reagensek mikrobiális és DNS-szennyezését.
- F. A fel nem használt reagensek és hulladék kezelésének összhangban kell lennie a megfelelő országos, szövetségi, állami és helyi előírásokkal.
- G. Ne használja a készleteket a lejáratí idő után.
- H. Ne öntsön össze különböző készletekből vagy gyártási tételekből származó reagenseket.
- I. A biztonsági adatlapok (SDS) igény esetén hozzáférhetőek a helyi Roche irodában.
- J. Viseljen kesztyűt, és a minták és **cobas® 4800** reagensek kezelése között váltson kesztyűt.
- K. Hogy a master mix munkareagens DNS mintával való kontaminálását elkerülje, az amplifikálást és kimutatást elkülönítve kell végezni a DNS-izolálástól. Az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani a master mix munkareagens elkészítése előtt. A megfelelő tisztításhoz valamennyi felületet, az állványokat és pipettákat is beleértve, gondosan le kell törölni 0,5%-os nátrium-hipoklorit* oldattal, majd 70%-os etanol oldattal.
*** MEGJEGYZÉS: A kereskedelembe kapható háztartási fehérítő rendszerint 5,25% koncentrációban tartalmaz nátrium-hipokloritot. Az 1:10 arányban hígított háztartási fehérítő 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldatnak felel meg.**
- L. A mintákat fertőzőként kell kezelni a *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ és az CLSI Document M29-A4¹⁵ előírásoknak megfelelő biztonságos laboratóriumi eljárásokat alkalmazva.
- M. A **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** és **DNA SD** reagensek nátrium-azidot tartalmaznak. 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.
- N. Viseljen védőszemüveget, 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.
- O. Minden egyszer használatos anyagot csak egyszer szabad felhasználni. Ne használja újra azokat.
- P. Ne használjon egyszer használatos termékeket a lejáratí idő után.
- Q. Ne használjon nátrium-hipoklorit-oldatot (fehérítőszert) a **cobas z 480** analizátor tisztításához. A **cobas z 480** analizátort a megfelelő **cobas® 4800** rendszer felhasználói kézikönyvének vagy **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletének eljárásaival tisztítsa.
- R. A **cobas z 480** analizátor fertőzési kockázatának csökkentésére vonatkozó további figyelmeztetéseket, óvintézkedéseket és eljárásokat lásd a **cobas® 4800** rendszer felhasználói kézikönyvében vagy a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében.
- S. Steril, egyszer használatos pipetták és DNáz-mentes pipettahegyek használata javasolt.

TÁROLÁSI ÉS KEZELÉSI KÖVETELMÉNYEK

- A. Ne fagyassza le a reagenseket.
- B. Az **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF OM**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** és **DNA SD** reagenseket tárolja 2 és 8 °C között. Felbontást követően ezek a reagensek 4 felhasználásig 60 napon át, illetve a lejáratí dátumig stabilak, amelyek előbb következnek.
- C. A **BRAF OM** és a (**BRAF OM** és **MGAC** oldatok **RXNMIX** reagenshez való hozzáadásával készült) master mix munkareagens fénytől védve tartandó.
- D. A (**BRAF OM** és **MGAC** oldatok **RXNMIX** reagenshez való hozzáadásával készült) master mix munkareagenst 2 és 8 °C között sötétben kell tárolni. Az előkészített mintákat és kontrollokat a master mix munkareagenshez annak elkészítésétől számított 1 órán belül hozzá kell adni.
- E. A feldolgozott minták (kivont DNS) legfeljebb 24 óráig stabilak 15 és 30 °C között, legfeljebb 14 napig 2 és 8 °C között, és legfeljebb 60 napig –15 és –25 °C között, illetve az, hogy –15 és –25 °C között tárolva átestek 3 fagyasztás–kiolvasztás cikluson. A kivont DNS amplifikálását az ajánlott tárolási időszak alatt, illetve a DNS kivonásához használt **cobas® DNA Sample Preparation Kit** lejáratí ideje előtt kell elvégezni attól függően, hogy melyik a korábbi időpont.
- F. Az amplifikálást a feldolgozott mintáknak és kontrolloknak a (**BRAF OM** és **MGAC** oldatok **RXNMIX** reagenshez való hozzáadásával készült) master mix munkareagenshez való hozzáadását követő 1 órán belül meg kell kezdeni.

A KÉSZLET TARTALMA

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

BRAF

24 teszt

RXNMIX

(reakció mix) (áttetsző gombos kupak)

MGAC

(magnézium-acetát) (sárga gombos kupak)

BRAF OM

(BRAF oligo mix) (fehér gombos fekete kupak)

BRAF MUT

(BRAF mutáns kontroll) (piros gombos kupak)

BRAF WT

(BRAF vad típus kontroll) (kék gombos kupak)

DNA SD

(DNS mintaoldószer) (lila gombos kupak)

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (DNS minta-előkészítő készlet; Roche M/N 05985536190)
 - **cobas®** 4800 rendszer mikrolemez (AD-lemez) és zárófilm (Roche M/N: 05232724001)
 - Állítható pipetták*: (kapacitás:10 µl, 20 µl, 200 µl és 1000 µl) aeroszolbarrieres vagy pozitív kiszorításos DNáz-mentes hegyekkel
 - Zárható fedelű mikrocentrifuga-csövek (1,5 ml-es, steril, RNáz-/DNáz-mentes, PCR minőségű) (tetszőleges gyártótól)
 - Spektrofotométer a DNS-koncentráció mérésére**
 - Vortex keverő**
 - Mikrocentrifugacső-állványok
 - Egyszer használatos kesztyűk, púdermentes
 - –15 és –25 °C közötti tárolásra alkalmas fagyasztó
- * *A pipettákat a gyártó utasításai szerint kell karbantartani, és pontosságuk a megadott térfogathoz képest 3%-on belül legyen. Aeroszolbarrieres vagy pozitív kiszorításos DNáz-mentes pipettahegyeket kell használni, amikor elő van írva a minta degradálódása és a keresztszennyeződés megelőzésére.*
- ** *Valamennyi felszerelést a gyártó utasításai szerint megfelelően karban kell tartani.*

Műszerek és szoftver

- **cobas z** 480 analízátor
- **cobas®** 4800 SR2 rendszervezérlő-egység Windows XP-vel
- **cobas®** 4800 SR2 rendszerszoftver 2.0 vagy újabb verzió
- BRAF analízis csomag szoftver 1.0 vagy újabb verzió
- Vonalkódolvasó (Roche M/N: 05339910001)
- Nyomtató, HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

MINTAVÉTEL, SZÁLLÍTÁS ÉS TÁROLÁS

MEGJEGYZÉS: *Valamennyi mintát fertőző anyag átvitelére alkalmasként kell kezelni.*

A. Mintavétel

Az FFPE-szövetmintákat validálták a **cobas** BRAF-teszttel való használathoz.

B. Mintaszállítás

Az FFPE-szövetminták 15 °C és 30 °C között szállíthatóak. Az FFPE-szövetminták szállításának meg kell felelnie az etiológiai anyagok szállítására vonatkozó országos, szövetségi, állami és helyi előírásoknak.¹⁶

C. Mintatárolás

A mintavétel idejét követően 12 hónapig 15 °C és 30 °C között tárolt FFPE-szövetminták stabilitását igazolták. A tárgylemezre ragasztott 5 µm-es FFPE-szövetmetszetek 15 °C és 30 °C között 60 napig tárolhatóak.

HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

MEGJEGYZÉS: Felhasználás előtt az RXNMIX, MGAC és BRAF OM kivételével valamennyi reagensnek szobahőmérsékletűnek kell lennie. Az RXN MIX, MGAC és BRAF OM a 2 °C és 8 °C közötti tárolást követően közvetlenül is felhasználható master mix munkareagens készítéséhez.

MEGJEGYZÉS: Csak legalább 50% daganatsejtet tartalmazó 5 µm vastagságú melanoma és PTC FFPE-szövetmetszetek használhatóak a cobas BRAF teszt során. Az 50%-nál kevesebb daganatsejtet tartalmazó mintákból deparaffinálás után makrometszetet kell készíteni.

MEGJEGYZÉS: A cobas z 480 analizátorra vonatkozó részletes használati utasításokat a cobas® 4800 rendszer felhasználói kézikönyvében vagy a cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében találja.

Futtatási mennyiség

A cobas BRAF tesztkészletet úgy tervezték, hogy segítségével legalább 3 minta plusz kontrollok, illetve legfeljebb 24 minta plusz kontrollok futtathatók. 3 mintánál plusz kontrolloknál kevesebb futtatható ugyan, de ez azt eredményezheti, hogy nem marad elegendő reagenstér fogat összesen 24 minta plusz két kontroll futtatására a készlettel. A cobas BRAF teszt 3 minta plusz két kontroll 8 alkalommal történő futtatásához elegendő reagenst tartalmaz. Minden futtatáshoz a cobas BRAF teszt mutáns kontrolljának [BRAFF MUT] és a cobas BRAF teszt vad típusú kontrolljának [BRAFF WT] egy-egy másodpéldánya szükséges (lásd a „Minőség-ellenőrzés” című részben).

Munkafolyamat

MEGJEGYZÉS: A cobas BRAF teszt futtatásonként maximum 24 mintához használható.

MEGJEGYZÉS: A reagensfelhasználás gazdaságosabbá tételéhez egy futtatásnak legalább három (3) betegmintát plusz két kontrollt kell tartalmaznia.

DNS-izolálás

A DNS izolálását FFPE-szövetmintából a cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) segítségével kell végezni.

Makrodisszekció

Ha a minta területenként 50%-nál kevesebb tumort tartalmaz, makrodisszekciót kell készíteni a minta-előkészítés részeként.

DNS mennyiségi meghatározása

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

- Vortexelje mindegyik DNS törzset 5 másodpercig a mennyiségi meghatározás előtt.
- Határozza meg a DNS mennyiségét spektrofotométer segítségével a gyártó utasításai szerint. A cobas® DNA Sample Preparation Kit **DNA EB** pufferét használja a készülék referenciamintájaként. 2 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 $\pm 2,0$ ng/µl-en belül kell lennie.
- A DNS-törzs koncentrációjának ≥ 5 ng/µl-nek kell a cobas BRAF teszt végzéséhez.

MEGJEGYZÉS: A DNS-törzsoldat koncentrációjának minden esetben legalább 5 ng/µl-nek kell lennie ahhoz, hogy a cobas BRAF tesztet el lehessen végezni. Ha a DNS-törzsoldat koncentrációja < 5 ng/µl, ismételje meg a deparaffinálás, DNS-izolálás és DNS-mennyiségimeghatározás lépéseit az adott mintára két 5 µm-es FFPE-szövetmetszet használatával. Tárgylemezre ragasztott metszetek esetén a deparaffinálást követően tegye ugyanabba a csőbe a két metszetből származó szövetet, merítse a szövetet a cobas® DNA Sample Preparation Kit TLB és PK elegyébe, és végezze el a DNS izolálását és mennyiségi meghatározását. Tárgylemezre nem ragasztott metszetek esetén tegye mind a két szövetmetszetet egy csőbe, majd deparaffinálja, és végezze el a DNS izolálását és mennyiségi meghatározását. Ha a DNS-törzsoldat még mindig < 5 ng/µl, kérjen másik FFPE-szövetmetszetmintát a mintát küldő intézménytől.

MEGJEGYZÉS: A feldolgozott minták (kivont DNS) legfeljebb 24 óráig stabilak 15 és 30 °C között, legfeljebb 14 napig 2 és 8 °C között, és legfeljebb 60 napig -15 és -25 °C között, illetve az, hogy -15 és -25 °C között tárolva átestek 3 fagyasztás–kiolvasztás cikluson. A kivont DNS amplifikálását az ajánlott tárolási időszak alatt, illetve a DNS kivonásához használt cobas® DNA Sample Preparation Kit lejárati ideje előtt kell elvégezni attól függően, hogy melyik a korábbi időpont.

AMPLIFIKÁLÁS ÉS KIMUTATÁS

MEGJEGYZÉS: *Hogy a master mix munkareagens DNS mintával való kontaminálását elkerülje, az amplifikálást és kimutatást elkülönítve kell végezni a DNS-izolálástól. Az amplifikálási és kimutatási munkaterületet alaposan meg kell tisztítani a master mix munkareagens elkészítése előtt. A megfelelő tisztításhoz valamennyi felületet, az állványokat és pipettákat is beleértve, gondosan le kell törölni 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldattal, majd 70%-os etanol oldattal. A kereskedelembe kapható 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 kézikönyvében vagy a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Tesztrendezés összeállítása:

A **cobas** BRAF-munkafolyamat lépéseit a **cobas® 4800** rendszer felhasználói kézikönyvében vagy a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Minta DNS-törzsoldata hígításának kiszámítása:

Csak egy amplifikálás/kimutatás van futtatva mintánként 5 ng/μl-es DNS törzs hígítás 25 μl-ének felhasználásával (összesen 125 ng). Az alábbi leírás ismerteti, hogyan kell 5 ng/μl-es DNS törzs hígításból legalább 35 μl-t készíteni a kiindulási DNS törzs koncentráció függvényében. Ez biztosítja, hogy minden minta tartalmazzon legalább 5 μl DNS törzset a kis mintatérfogatok pipettázásakor előforduló pontatlanság elkerülése végett.

Hígítás kiszámítása 5–35 ng/μl minta DNS törzs koncentrációk esetén

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

MEGJEGYZÉS: *Csak egy amplifikálás/kimutatás van futtatva mintánként 5 ng/μl-es DNS törzs hígítás 25 μl-ének felhasználásával (összesen 125 ng).*

- A. Minden mintához az alábbi képlet segítségével határozza meg a szükséges DNS törzs mennyiségét:
Szükséges DNS-törzsoldat-mennyiség = $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{DNS-törzsoldat-koncentráció ng}/\mu\text{l-ben}$
- B. Minden mintához az alábbi képlet segítségével határozza meg a szükséges DNS mintaoldószer (**DNA SD**) mennyiségét:
Szükséges DNA SD térfogat (μl) = $35 \mu\text{l} - \text{szükséges DNS törzs térfogat } (\mu\text{l})$.
- Példa:
DNS-törzsoldat koncentrációja = 21 ng/μl
- A. Szükséges DNS-törzsoldat-mennyiség = $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 21 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8,3 \mu\text{l}$
- B. Szükséges DNA SD térfogat (μl) = $(35 \mu\text{l} - 8,3 \mu\text{l}) = 26,7 \mu\text{l}$

Hígítás kiszámítása > 35 ng/μl minta DNS törzs koncentrációk esetén

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

MEGJEGYZÉS: *Csak egy amplifikálás/kimutatás van futtatva mintánként 5 ng/μl-es DNS törzs hígítás 25 μl-ének felhasználásával (összesen 125 ng).*

- A. Ha a DNS-törzskoncentráció > 35 ng/μl, használja az alábbi képletet a DNS-mintaoldószer (**DNA SD**) mennyiségének kiszámításához, amely legalább 35 μl hígított DNS-törzsoldat készítéséhez szükséges. Így biztosítsa, hogy minden mintába legalább 5 μl DNS-törzsoldat kerüljön.
DNA SD szükséges mennyisége μl-ben = $[(5 \mu\text{l} \text{ DNS-törzsoldat} \times \text{DNS-törzsoldat-koncentráció (ng}/\mu\text{l)}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$
- B. 5 μl DNS-törzsoldat hígításához használja a **DNA SD** kiszámított mennyiségét.
- Példa:
DNS-törzsoldat koncentrációja = 42 ng/μl
- A. DNA SD szükséges mennyisége μl-ben = $[(5 \mu\text{l} \times 42 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div (5 \text{ ng}/\mu\text{l})] - 5 \mu\text{l} = 37 \mu\text{l}$
- B. 5 μl DNS-törzsoldat hígításához használja a **DNA SD** kiszámított mennyiségét.

Mintahígítás

- A. Készítse elő a kívánt számú 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövet a minta DNS törzs hígításhoz, és lássa el őket a megfelelő mintazonosítóval a mintabemérő területen.
- B. Aeroszol-rezisztens pipettahegygel ellátott pipetta segítségével pipettázza a kiszámított DNS mintaoldószer (**DNA SD**) térfogatot a megfelelően jelölt mintacsőbe.
- C. Vortexeljen minden egyes minta DNS törzset 10 másodpercig.

- D. Aeroszol-rezisztens pipettaheggyel ellátott pipetta segítségével óvatosan pipettázza minden minta DNS-törzsből a számított térfogatot a megfelelően jelölt **DNA SD** oldószert tartalmazó csőbe. Használjon új pipettahegyet minden egyes mintához.
- E. Tegye rá a kupakot a csövekre, majd 10 másodperces vortexeléssel keverje össze mindegyik hígított minta DNS törzset.
- F. Cseréljen kesztyűt.

Master mix (MMX) munkareagens készítése

MEGJEGYZÉS: A BRAF oligo mix és az MMX munkareagens fényérzékeny. A BRAF OM és az MMX munkareagens nyitott elegye fénytől védve tartandó.

- A. Számítsa ki a szükséges **RXNMIX** térfogatot az alábbi képlet segítségével:
Szükséges **RXNMIX** térfogat = (minták száma + 2 kontroll + 1) × 10 µl
- B. Számítsa ki a szükséges **BRAF OM** térfogatot az alábbi képlet segítségével:
Szükséges **BRAF OM** térfogat = (minták száma + 2 kontroll + 1) × 8 µl
- C. Számítsa ki a szükséges **MGAC** térfogatot az alábbi képlet segítségével:
Szükséges **MGAC** térfogat = (minták száma + 2 kontroll + 1) × 7 µl
- Az 1. táblázat segítségével meghatározhatja az egyes reagenseknek az MMX munkareagens készítéséhez szükséges térfogatát a futtatásban részt vevő minták száma alapján.

1. táblázat

		MMX munkareagenshez szükséges reagenstérfogatok									
		Minták száma*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µl	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µl	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Össztérfogat (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Minták száma + 2 kontroll + 1

- D. Vegyen ki a hűtőből 2 °C és 8 °C között tárolt megfelelő számú **RXNMIX**, **BRAF OM** és **MGAC** csövet. Használat előtt vortexelje mindegyik reagenst 5 másodpercig, hogy a cső aljára gyűjtse a folyadékot. Jelöljön meg egy steril mikrocentrifuga csövet a master mix (MMX) munkareagens számára.
- E. Mérje az **RXNMIX** kiszámított térfogatát a kijelölt MMX csőbe.
- F. Mérje a **BRAF OM** kiszámított térfogatát a kijelölt MMX csőbe.
- G. Mérje az **MGAC** kiszámított térfogatát a kijelölt MMX csőbe.
- H. A megfelelő keveredés érdekében vortexelje a csövet 5 másodpercig.

MEGJEGYZÉS: Csak cobas® 4800 rendszer mikrolemezt (AD-lemez) és zárófilmet (Roche M/N: 05232724001) használjon.

- I. Gondosan mérjen 25 µl MMX munkareagenst az AD-lemeznek a futtatáshoz szükséges minden reakciólyukába. Ügyeljen, hogy a pipetta hegye ne érjen a lemezhez az adott lyukon kívül.

Kontrollok és minták hozzáadása:

- A. Mérjen 25 µl **BRAF MUT** kontrollt az AD-lemez **A01** lyukába, és keverje jól össze a pipettát a lyukon belül legalább kétszer felszívva és kiürítve.
- B. Új pipettahegyet használva mérjen 25 µl **BRAF WT** kontrollt az AD-lemez **B01** lyukába, és keverje jól össze a pipettát a lyukon belül legalább kétszer felszívva és kiürítve.

MEGJEGYZÉS: Minden futásnak tartalmaznia kell egy BRAF MUT kontrollt az A01 pozícióban és egy BRAF WT kontrollt a B01 pozícióban, különben a cobas z 480 analízátor érvényteleníti a futtatást.

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

- C. Aeroszol-rezisztens pipettaheggyel ellátott pipetta segítségével mérjen 25 µl hígítottminta-DNS-t az MMX munkareagenst tartalmazó megfelelő lyukba az AD-lemezen a **C01** pozíciótól kezdve a(z) 1. ábra elrendezése szerint. Keverje jól össze a reakcióelegyet a pipettát a lyukon belül legalább kétszer felszívva és kiürítve. Ellenőrizze, hogy az összes folyadék a lyuk aljára gyűlt.

MEGJEGYZÉS: A minta DNS-ét és kontrollokat a Master Mix (MMX) munkareagenshez annak elkészítésétől számított 1 órán belül helyezze az AD-lemezre.

1. ábra

Lemez elrendezés minta												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRAF MUT	Minta 7	Minta 15	Minta 23								
B	BRAF WT	Minta 8	Minta 16	Minta 24								
C	Minta 1	Minta 9	Minta 17									
D	Minta 2	Minta 10	Minta 18									
E	Minta 3	Minta 11	Minta 19									
F	Minta 4	Minta 12	Minta 20									
G	Minta 5	Minta 13	Minta 21									
H	Minta 6	Minta 14	Minta 22									

D. Folytassa, amíg valamennyi vizsgálati mintát az AD-lemezre nem helyezte.

E. Fedje le az AD-lemezt zárófilmmel (a lemezek csomagjából). A zárófilm-felhelyező segítségével gondoskodjon arról, hogy a zárófilm légmentesen illeszkedjen az AD-lemezre.

F. Az amplifikálás és kimutatás indítása előtt ellenőrizze, hogy az összes folyadék az egyes lyukak aljára gyűlt.

MEGJEGYZÉS: Az amplifikálást és kimutatást a minta DNS-nek és kontrolloknak az MMX munkaoldathoz való hozzáadását követő 1 órán belül meg kell kezdeni.

PCR indítása

A BRAF-munkafolyamat lépéseire vonatkozó részletes utasításokat a **cobas® 4800** rendszer felhasználói kézikönyvében vagy a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletében találja.

Eredmények értelmezése

MEGJEGYZÉS: A futtatások és minták minden validálását a **cobas® 4800 BRAF AP** szoftver végzi.

MEGJEGYZÉS: Egy érvényes futás tartalmazhat érvényes és érvénytelen mintaeredményeket is.

Érvényes futtatás esetén a mintaeredmények értelmezését a 2. táblázat szerint végezze.

2. táblázat

A mintaeredmények értelmezése

cobas BRAF teszteredmény	Értelmezés
Mutation Detected	V600-mutáció kimutatható a 15-ös exonban a BRAF 600-as kodonhelyen
Mutation Not Detected vagy No Mutation Detected*	V600-mutáció nem mutatható ki a 15-ös exonban a BRAF 600-as kodonhelyen
Invalid	Érvénytelen eredmény. Az érvénytelen eredményű minták vizsgálatát ismételje meg az alábbi Érvénytelen eredményű minták ismételt vizsgálata szakaszban leírtak szerint.
Failed	Hibás futtatás hardver- vagy szoftverhiba miatt.

* A „Mutation Not Detected” vagy „No Mutation Detected” (mutáció kimutatható/nem mutatható ki) eredmény nem zárja ki mutáció jelenlétét a BRAF 600-as kodonhelyen, mert az eredmények a mintában lévő mutáns szekvenciakópiák számától függnek, ezért hatással lehet rájuk a minták integritása, az izolált DNS mennyisége és a zavaró anyagok jelenléte.

Érvénytelen eredményű minták újratestelése

- A. Ismételje meg az érvénytelen minta DNS törzs hígítását az **AMPLIFIKÁLÁS ÉS KIMUTATÁS** szakaszban leírt **Minta DNS törzs hígítás kiszámítása és Minta hígítás** műveletektől kezdve.

Megjegyzés: Ha a DNS-törzs egy új hígításához nem maradt elegendő minta DNS-törzsoldat, új 5 µm-es szövetmetszetből izolálja újra a DNS-t a **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** segítségével, majd folytassa az alábbi B. lépéssel.

- B. Miután a **Mintahígítás** szakaszban leírtak szerint elvégezte a DNS törzs hígítását 5 ng/µl-re, végezzen egy további 1:2 hígítást úgy, hogy a hígított DNS törzs 20 µl-éhez hozzáad 20 µl DNS mintaoldószert (**DNA SD**).
- C. Folytassa a **Master mix (MMX) munkareagens készítése** szakasszal és az amplifikálás és kimutatás hátralévő műveleteivel.

Megjegyzés: Ha a minta érvénytelen marad az 1:2 hígítás melletti ismételt teszteléskor is, ismételje meg a teljes tesztelést az adott mintára. Kezdje a DNS izolálásával a **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** segítségével új 5 µm-es FFPE-szövetmetszetből. A standard 25 µl DNS-t 5 ng/µl koncentrációban (további hígítás nélkül) kell alkalmazni amplifikálásra és kimutatásra.

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

A **cobas** BRAF teszt mutáns (**BRAF MUT**) kontroll és vad típus (**BRAF WT**) kontroll minden futtatásban szerepel. Egy futtatás akkor érvényes, ha mind a **BRAF MUT** kontroll lyuk (**A01**), mind a **BRAF WT** kontroll lyuk (**B01**) érvényes kontroll állapotú. Ha akár a **BRAF MUT** kontroll, akár a **BRAF WT** kontroll érvénytelen, a futtatást meg kell ismételni. Készítsen friss hígítást a korábban izolált minta DNS-törzsoldatából, és állítson össze egy új AD-lemezt kontrollokkal az amplifikáláshoz és kimutatáshoz.

BRAF mutáns kontroll

A **BRAF MUT** kontroll eredménye „Valid” kell, hogy legyen. Ha a **BRAF MUT** kontroll eredménye következetesen érvénytelen lesz, technikai segítségért vegye fel a kapcsolatot a helyi Roche irodával.

BRAF vad típus kontroll

A **BRAF WT** kontroll eredménye „Valid” kell, hogy legyen. Ha a **BRAF WT** kontroll eredménye következetesen érvénytelen lesz, technikai segítségért vegye fel a kapcsolatot a helyi Roche irodával.

AZ ELJÁRÁSSAL KAPCSOLATOS ÓVINTÉZKEDÉSEK

Mint minden teszteljárásnál, a helyes laboratóriumi technika alapvető a vizsgálat megfelelő kivitelezéséhez. A PCR-alapú vizsgálatok nagy analitikai érzékenysége miatt ügyeljen arra, hogy a reagensek és amplifikálási keverékek szennyeződéstől mentesek maradjanak.

ELJÁRÁSSAL KAPCSOLATOS KORLÁTOZÁSOK

1. Csak a feltüntetett mintatípusokat tesztelje. A **cobas** BRAF tesztet csak melanoma- és PTC FFPE-szövetminták vizsgálatára validálták.
2. A **cobas** BRAF mutációtesztet csak a **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (Roche M/N: 05985536190) való használatához validálták genomiális DNS extrahálására.
3. Egy mutáció kimutatása a mintában lévő mutáns szekvenciakópiák számától függ, ezért befolyásolhatja a minta integritása, az izolált DNS mennyisége és zavaró anyagok jelenléte is.
4. A megbízható eredmény a megfelelő mintalevételen, szállításon, tároláson és feldolgozáson múlik. Kövesse a mellékelt útmutatót, valamint a **cobas® 4800** rendszer felhasználói kézikönyvének vagy a **cobas® 4800** rendszer felhasználói segédletének utasításait.
5. Az AmpErase enzim hozzáadása a **cobas** BRAF teszt Master Mixhez lehetővé teszi a target DNS szelektív amplifikálását, ugyanakkor a reagensek szennyeződésének elkerüléséhez a helyes laboratóriumi gyakorlat és ezen használati utasításban meghatározott eljárások gondos betartása szükséges.
6. A terméket csak a PCR-technikák alkalmazására és a **cobas® 4800** rendszer használatára kiképzett dolgozók használhatják.
7. Csak a **cobas® 4800** rendszert validálták a termékkel való használatához. Más PCR rendszert nem validáltak a termékkel való használatához.
8. A technológiák különbözősége miatt javasolt, hogy az egyik technológiáról a másikra való áttéréskor a felhasználók végezzenek korrelációs laboratóriumi vizsgálatokat, hogy a technológiák közötti különbség minősíthető legyen.
9. Egyéb potenciális változók, például különböző mintafixálási lehetőségek hatását nem vizsgálták.
10. Ritkán bár, de előfordulhat, hogy a **cobas** BRAF teszt primerei vagy próbái által lefedett BRAF gén régióiban levő mutációk és variánsok következtében a BRAF V600 allél amplifikálása, illetve a 600-as kodon mutációjának kimutatása sikertelen lesz.
11. PCR-inhibitorok jelenléte álnegatív vagy érvénytelen eredményeket okozhat.
12. A melanin a PCR-reakciók ismert inhibitora. A DNS-minta-előkészítő készlet az extrahálás során eltávolítja a melanint a mintából, a mintában lévő melanin azonban ennek ellenére érvénytelen eredményeket okozhat. Ha felmerül a melanin gátló hatásának gyanúja, ajánlatos megismételni a vizsgálatot 1:2 hígítás mellett az „Érvénytelen eredményű minták ismételt vizsgálata” szerint.

13. A **cobas** 4800 BRAF V600 mutáció teszt korlátozottan keresztreaktivitást mutat nem-V600E mutáns mintákkal (V600K, V600D és V600E2). További részletekért lásd a „Melanoma - Nem klinikai értékelés” szakaszt.
14. Degradált DNS-t tartalmazó FFPE-szövetminták befolyásolhatják a teszt mutáció-kimutatási képességét.
15. A **cobas** 4800 BRAF mutáció teszt egy kvalitatív vizsgálat. A teszt nem alkalmas a mutáció mennyiségi meghatározására.

I. MELANOMA

NEM KLINIKAI ÉRTÉKELÉS

Az alább ismertetett nem klinikai vizsgálatok során a %-os tumortartalmat patológiai vizsgálattal, a melanin tartalmat patológiai vizsgálattal és belső melaninmeghatározási módszerrel határozták meg. A mintákat bidirekcionális Sanger-féle szekvenálással választották ki vizsgálatra. A mutáció százalékos szintjét 454 szekvenálás (kvantitatív, masszívan párhuzamos pirosekvenciálási módszer) segítségével határozták meg.

Analitikai érzékenység

Analitikai érzékenység – Kimutatási határ (LoD)

A bevitt DNS minimális mennyiségét, amely az esetek 95%-ában helyes eredményt ad, három mintatípusból készített hígítási panelek segítségével vizsgálták:

- Mintakeverékek, amelyeket BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintákból és BRAF vad típus FFPE-szövetmintákból származó DNS törzsek összekeverésével készítettek adott mutációs szinteknek megfelelően.
- Egyéni FFPET DNS törzsek, amelyeket három BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintából készítettek.
- Sejtvonalkeverék, amelyet BRAF V600E mutáns sejtvonalból és BRAF vad típus sejtvonalból származó DNS törzsek összekeverésével készítettek.

Hogy meghatározzák az egyes minták százalékos mutációját, a vizsgálatban használt valamennyi mintát 454 szekvenálással szekvenálták.

Analitikai érzékenység mintakeverék segítségével

BRAF V600E mutáns FFPE-szövetminta DNS törzseket úgy kevertek BRAF vad típus FFPE-szövetminta DNS törzsekkel, hogy egy minta ~10%, három minta ~5% és egy minta ~3% mutációs szinten legyen. Egy BRAF vad típus mintát ugyancsak vizsgáltak. Az összekeverést követően a mutációs szinteket 454 szekvenálással ellenőrizték. Az öt V600E mutációt tartalmazó mintakeverék mindegyikéből (de a vad típus mintából nem) a 3. táblázat részletezett paneltagoknak megfelelő hígítások készültek.

3. táblázat
Hígítási panel tagok készítése mintakeverékből

Keverék	Átlag % mutáció*	DNS mennyiség hígítási panel tagokban (ng/25 µl)**
10% keverék	9% (n = 6)	125, 62,5, 31,3
5% keverék 1	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5% keverék 2	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5% keverék 3	6% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
2,5% keverék	3% (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0% (csak vad típus)	- - -	125

* A keverék átlagos százalékos mutációtartalma 454 szekvenálással.

** Az egyes paneltagok genomi DNS tartalma. 25 µl a minta beviteli térfogat a teszt során.

Minden paneltag nyolc-nyolc (8) ismétlését futtatták **cobas** BRAF tesztkészlet 3 gyártási tételének mindegyikével (n = 24/paneltag). A 4. táblázat az egyes FFPE mintakeverékek érzékenységét mutatja, amelyet úgy határoztak meg, mint az a legkisebb DNS mennyiség, amely legalább 95%-ban BRAF V600E „Mutation Detected” eredményt ad (szürkén kiemelt sorok).

4. táblázat
A cobas BRAF teszt érzékenysége FFPE-szövetmintakeverékekkel

FFPE-szövetkeverék	Százalékos mutáció 454 szekvenálással	DNS mennyiség a paneltagban	„Mutation Detected” arány (n = 24)
10% FFPE-szövetkeverék	9%	125 ng/25 µl	100%
		62,5 ng/25 µl	100%
		31,3 ng/25 µl	100%
5% FFPE-szövetkeverék 1	5%	125 ng/25 µl	96%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	75%
		0,6 ng/25 µl	88%
		0,3 ng/25 µl	71%
5% FFPE-szövetkeverék 2	5%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	92%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	96%
		0,6 ng/25 µl	58%
		0,3 ng/25 µl	50%
5% FFPE-szövetkeverék 3	6%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	100%
		0,6 ng/25 µl	96%
		0,3 ng/25 µl	71%
2,5% FFPE-szövetkeverék	3%	125 ng/25 µl	0%
		62,5 ng/25 µl	4%
		31,3 ng/25 µl	4%
0% (vad típus)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Ez a vizsgálat megmutatja, hogy a **cobas** BRAF teszt képes a BRAF V600E mutáció kimutatására $\geq 5\%$ mutációs szintnél a standard 125 ng/25 µl bevitt DNS mennyiség mellett. A teszt képes alacsonyabb bevitt DNS szintek mellett is a mutáció kimutatására, ami azt jelenti, hogy bár a minták a fixálási eljárás következtében degradált DNS-t tartalmazhatnak, mégis kimutatható marad a mutáció. A BRAF vad típus minta esetén végzett valamennyi vizsgálat „Mutation Not Detected” eredményt adott.

Analitikai érzékenység FFPE-szövetminták segítségével

Az 5%-os mutációkimutatási képesség igazolására betegmintákban a következő vizsgálatot végezték: 3 BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintából készült negyvennyolc egyéni, 6%, 12% és 4% mutációsintű 5 µm-es metszetet dolgoztak fel egyenként úgy, hogy a DNS-izoláláshoz a **cobas**® DNS-minta-előkészítő készlet 3 gyártási tételét használták. A melanin zavaró hatását úgy vizsgálták, hogy egy minta (6% mutáció) magas melanin koncentrációjú volt. Minden metszet DNS-éből sorozathígítás készült: egy 6 paneltagból álló sorozat (részletek a 5. táblázat).

5. táblázat
Hígítási panel tagok készítése FFPE-szövetmintából

FFPE-szövetminta	Minta információ		DNS mennyiség hígítási panel tagokban (ng/25 µl)
	Átlag % V600E mutáció*	Pigmenttartalom	
Minta 1	6%	Erősen pigmentált**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Minta 2	12%	NEP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Minta 3	4%	NEP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* A minta átlagos százalékos mutációtartalma 454 szekvenálással.

** Erősen pigmentált vizuálisan vizsgálva, melanin koncentráció = 0,17 µg/25 µl.

*** NEP = nem erősen pigmentált vizuálisan vizsgálva.

Minden paneltag 16 ismétlését futtatták a **cobas** BRAF tesztkészlet 3 gyártási tételének mindegyikével (n = 48/paneltag). Az egyes FFPE-szövetminták esetén az érzékenységet úgy határozták meg, mint az a legkisebb DNS mennyiség, amely legalább 95%-ban BRAF V600E „Mutation Detected” eredményt ad (szürkén kiemelt sorok). A vizsgálat eredményei a 6. táblázat láthatóak.

6. táblázat
A cobas BRAF teszt érzékenysége FFPE-szövetminták segítségével

FFPE-szövetminta	Százalékos mutáció 454 szekvenálással	DNS mennyiség a paneltagban	„Mutation Detected” arány (n = 48)
Minta 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	98%
		2,0 ng/25 µl	81%
		1,0 ng/25 µl	71%
Minta 2	12%	125 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	100%
		3,9 ng/25 µl	100%
		2,0 ng/25 µl	98%
		1,0 ng/25 µl	98%
		0,5 ng/25 µl	94%
Minta 3	4%	125 ng/25 µl	98%
		31,3 ng/25 µl	98%
		15,6 ng/25 µl	85%
		7,8 ng/25 µl	90%
		3,9 ng/25 µl	90%
		2,0 ng/25 µl	67%

Ez a vizsgálat megmutatta, hogy a **cobas** BRAF teszt képes a BRAF V600E mutáció kimutatására konkrét klinikai FFPE-szövetmintákban ≥ 5% mutációsintnél a standard 125 ng/25 µl bevitt DNS mennyiség mellett. A teszt képes alacsonyabb bevitt DNS szintek mellett is a mutáció kimutatására, ami azt jelenti, hogy bár a minták a fixálási eljárás következtében degradált DNS-t tartalmazhatnak, mégis kimutatható marad a mutáció. A vizsgálatban szereplő egyetlen erősen pigmentált minta nem úgy tűnt, hogy befolyásolná a teszt érzékenységét.

Analitikai érzékenység sejtvonalkeverék segítségével

Két melanoma sejtvonalból [SK-MEL 28 (BRAF V600E mutáns) és SK-MEL 2 (BRAF vad típus)] származó DNS törzsekből készítettek 5% mutációs szintű keverékmintát, amelyet 454 szekvenálással ellenőriztek. Három darab 125 ng/25 µl – 0 ng/25 µl DNS-t tartalmazó önálló hígítási panelt készítettek. Minden paneltag 20 ismétlését vizsgálták a **cobas** BRAF 3 gyártási tételével (összesen 60 ismétlés). Az érzékenységet úgy határozták meg, mint az a legkisebb DNS mennyiség, amely legalább 95%-ban BRAF V600E „Mutation Detected” eredményt ad (szürkén kiemelt sor). A vizsgálat eredményei a 7. táblázat láthatóak.

7. táblázat

A **cobas** BRAF teszt érzékenysége sejtvonalkeverék segítségével

Sejtvonalkeverék	Átlagos százalékos mutáció 454 szekvenálással	DNS mennyiség a paneltagban	„Mutation Detected” arány (n = 60)
Sejtvonalkeverék	5%	125,0 ng/25 µl	97%
		31,3 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	95%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	95%
		2,0 ng/25 µl	82%
		1,0 ng/25 µl	78%
		0,5 ng/25 µl	77%

A **cobas** BRAF teszt 95%-os „Mutation Detected” arányt adott 3,9 ng/25 µl mellett, ami 1:32 arányú hígítást jelent az ajánlott 125 ng/25 µl beviteli DNS-mennyiséghez képest. Ez azt jelenti, hogy a teszt akkor is kimutatná a BRAF V600E mutációt, amikor a DNS ~97%-a degradálódott a fixálás során, feltételezve azt, hogy a sejtvonal DNS 100%-ban intakt és amplifikálható DNS-t tartalmazott.

Genomi beviteli tartomány:

Az ajánlott beviteli DNS mennyiség a **cobas** BRAF teszthez 125 ng. DNS mennyiségi hibák és/vagy eltérések a degradált DNS mennyiségében különböző beviteli genomi DNS mennyiségeket eredményezhetnek. A különböző beviteli genomi DNS mennyiségek hatásának vizsgálatára genomi DNS-t extraháltak 11 melanoma FFPE-szövetmintából, amelyeket mutációs állapot és pigmenttartalom szerint szelektáltak, és hígítási sort készítettek a következő beviteli mennyiségeknek megfelelően: 250 ng, 125 ng, 62,5 ng és 31,3 ng/25 µl. Mind a 4 DNS szintet 2 különböző gyártási tétellel értékelték. Valamennyi genomi DNS beviteli mennyiség esetén a várt eredményeket kapták.

Minimális tumortartalom

Harminchárom (33) BRAF V600E mutáns mintát vizsgáltak, hogy meghatározzák azt a minimális tumorarányt, ami szükséges a BRAF V600E mutáció kimutatásához 5–50% tumortartalmú mintákban makrometszet készítése nélkül. Minden mintából egy (1) metszetet vizsgáltak a **cobas** BRAF teszt segítségével.

A **cobas** BRAF teszt helyesen azonosított minden olyan BRAF V600E mutáns mintát, amelynek minimális mutáns-DNS-tartalma 5% feletti volt, és amikor a minimális tumortartalom legalább 15% volt; lásd a 8. táblázat. A 15%-osnál alacsonyabb tumortartalmú és 5%-osnál alacsonyabb mutációs szintű mintákra a vizsgálat „Mutation Not Detected” eredményt adott. További 24 vad típusú mintát is vizsgáltak 5–45% tumortartalommal az ajánlott DNS beviteli koncentráció (125 ng/25 µl) mellett. A vizsgálat valamennyi vad típusú mintát helyesen azonosította. A területhez viszonyítva < 50%-nál kisebb tumortartalmú mintákból makrometszetet kell készíteni.

8. táblázat

33 különböző százalékos tumortartalmú és mutációtartalmú BRAF V600E minta vizsgálati eredményei

Mintasorszám	Tumortartalom*	% mutáció	Teszteredmény
1	5% / 5%	3%	Mutation Not Detected
2	5% / 5%	5%	Mutation Not Detected
3	5% / 5%	1%	Mutation Not Detected
4	10% / 10%	4%	Mutation Not Detected
5	10% / 10%	14%	Mutation Detected
6	15% / 10%	6%	Mutation Detected
7	15% / 15%	23%	Mutation Detected
8	15% / 15%	3%	Mutation Detected
9	15% / 15%	29%	Mutation Detected
10	15% / 15%	14%	Mutation Detected

Mintas szám	Tumortartalom*	% mutáció	Teszteredmény
11	15% / 15%	14%	Mutation Detected
12	15% / 20%	5%	Mutation Detected
13	20% / 20%	28%	Mutation Detected
14	20% / 20%	2%	Mutation Detected
15	25% / 20%	13%	Mutation Detected
16	25% / 25%	25%	Mutation Detected
17	30% / 25%	20%	Mutation Detected
18	30% / 30%	10%	Mutation Detected
19	30% / 35%	4%	Mutation Detected
20	30% / 35%	17%	Mutation Detected
21	35% / 30%	8%	Mutation Detected
22	35% / 35%	7%	Mutation Detected
23	35% / 35%	12%	Mutation Detected
24	35% / 35%	22%	Mutation Detected
25	35% / 40%	36%	Mutation Detected
26	40% / 35%	7%	Mutation Detected
27	40% / 35%	12%	Mutation Detected
28	40% / 40%	14%	Mutation Detected
29	40% / 40%	21%	Mutation Detected
30	40% / 40%	28%	Mutation Detected
31	40% / 45%	36%	Mutation Detected
32	45% / 45%	10%	Mutation Detected
33	50% / 40%	8%	Mutation Detected

** A minták tumortartalmát úgy határozták meg, hogy mintánként tizenkét egymás melletti 5 µm-es metszetből az elsőt és az utolsót vizsgálta egy patológus. A táblázatban fel van tüntetve mind az első, mind az utolsó metszet tumortartalma (például 95% / 95%).*

Keresztreaktivitás

A **cobas** BRAF teszt keresztreaktivitását az alábbi mintatípusok segítségével vizsgálták:

- BRAF nem-V600E mutáns melanoma FFPE-szövetminták különböző mutációs szint mellett,
- BRAF non-V600E mutációjú plazmidok,
- BRAF homológ plazmidok,
- Bőrrel kapcsolatos mikroorganizmusok.

A keresztreaktivitást úgy is értékelték, hogy azt vizsgálták, hogy BRAF homológ plazmidok vagy bőrrel kapcsolatos mikroorganizmusok jelenléte zavarja-e a BRAF V600E mutáció kimutatását.

BRAF Non-V600E melanoma FFPE-szövetminták

Tizennégy (14) BRAF nem-V600E mutáns (V600D, V600E2, V600R, illetve V600K) melanoma FFPE-szövetmintát vizsgáltak három-három párhuzamos mintaként a **cobas** BRAF teszttel. Nyolc BRAF nem-V600E minta esetén mindhárom ismétlés keresztreaktivitást mutatott a **cobas** BRAF teszttel. A nyolc minta a következő típusú volt: BRAF V600D mutáns (18%-os mutáció), BRAF V600E2 mutáns (68%-os mutáció) és BRAF V600K mutáns (30%-osnál nagyobb mutáció). Nem figyeltek meg keresztreaktivitást a BRAF V600R mutáns (23% mutáció) minta esetén, ahogy azt a 9. táblázat mutatja.

9. táblázat**A cobas BRAF teszt által kimutatott BRAF nem-V600E mutációk aránya FFPE-szövetmintáknál**

Mintaszám	BRAF mutációs állapot	Százalékos mutáció	Tumortartalom*	Tumorstádium	„Mutation Detected” arány (n = 3)
1	V600D	18%	30% / 30%	IV	100%
2	V600E2	16%	75% / 75%	IV	0%
3		36%	75% / 80%	III	0%
4		68%	75% / 75%	IV	100%
5	V600R	23%	15% / 15%	IV	0%
6	V600K	17%	25% / 25%	III	0%
7		22%	35% / 40%	IV	0%
8		23%	40% / 40%	IV	0%
9		31%	60% / 60%	IV	100%
10		35%	75% / 75%	IV	100%
11		39%	80% / 80%	IV	100%
12		36%	95% / 95%	IIC	100%
13		62%	75% / 75%	IV	100%
14		69%	80% / 80%	IV	100%

* A minták tumortartalmát úgy határozták meg, hogy mintánként tizenkét egymás melletti 5 µm-es metszetből az elsőt és az utolsót vizsgálta egy patológus. A táblázatban fel van tüntetve mind az első, mind az utolsó metszet tumortartalma (például 95% / 95%).

Egy tizenegy tagú hígítási panelt készítettek 5,0–0,0049 ng/µl DNS koncentrációkkal (ez megfelel a tesztnek 125–0,1 ng DNS-nek 25 µl beviteli térfogatban), és minden egyes paneltagot három párhuzamos ismétlésben vizsgálták, hogy meghatározzák azt a legkisebb DNS mennyiséget, amely még 100% Mutation Detected arányt ad a nyolc minta esetén, amelyek keresztreaktívnak a **cobas** BRAF teszt során. A keresztreaktivitás elvesztése előtti legkisebb DNS beviteli szintet vizsgálták, amely 0,5 ng/25 µl-től (BRAF V600K mutáns minta 69% mutációval) 15,6 ng/25 µl-ig (BRAF V600D mutáns minta 18% mutációval) terjedt (10. táblázat).

10. táblázat**A legkisebb DNS-bevitel, amely még keresztreakciót okoz a cobas BRAF teszt során**

Mintaszám	BRAF mutációs állapot	Százalékos mutáció	Legkisebb DNS beviteli mennyiség a keresztreaktivitás elvesztése előtt (n = 3)
1	V600D	18%	15,6 ng/25 µl
2	V600E2	68%	7,8 ng/25 µl
3	V600K	31%	3,9 ng/25 µl
4		35%	3,9 ng/25 µl
5		39%	3,9 ng/25 µl
6		36%	2,0 ng/25 µl
7		62%	3,9 ng/25 µl
8		69%	0,5 ng/25 µl

BRAF non-V600E plazmidok

5–75% mutációs szintű plazmid hígítási paneleket készítettek vad típusú plazmiddal a háttérben a következő kilenc BRAF nem-V600E mutációra: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K és V600R. A hígítási panelek minden tagjából három ismétlést készítettek minden plazmidhoz, és ezeket vizsgálták a **cobas** BRAF teszttel. Keresztreaktivitást észleltek mindhárom ismétlésnél a BRAF V600D plazmid esetén $\geq 10\%$ mutációs szint mellett, a BRAF V600K plazmid esetén $\geq 35\%$ mutációs szint mellett és a BRAF V600E2 plazmid esetén $\geq 65\%$ mutációs szint mellett. A többi hat, vizsgálatban részt vevő BRAF mutációs plazmid esetén nem figyeltek meg keresztreakciót.

BRAF homológ plazmidok

Mintákat készítettek három BRAF homológ plazmidból (BRAF pszeudogén, ARAF és RAF1), BRAF V600E mutáns plazmidból és BRAF vad típus plazmidból, ahogy azt a 11. táblázat mutatja. Minden egyes paneltag három-hat ismétlését vizsgálták a **cobas** BRAF teszt segítségével.

11. táblázat
BRAF homológ plazmid minták

Panel		Térfogatösszetétel	
Név	Tag	1. összetevő	2. összetevő
BRAF pszeudogén	1	95% BRAF pszeudogén	5% BRAF V600E mutáns
	2	100% BRAF pszeudogén	- - -
ARAF	1	95% ARAF	5% BRAF V600E mutáns
	2	100% ARAF	- - -
RAF1	1	95% RAF1	5% BRAF V600E mutáns
	2	100% RAF1	- - -
Kontroll	1	95% BRAF vad típus	5% BRAF V600E mutáns
	2	100% BRAF vad típus	- - -
	3	95% DNS eluáló puffer	5% BRAF V600E mutáns

A **cobas** BRAF teszt a három vizsgált BRAF-homológ plazmid egyikét sem mutatta ki, amikor önmagukban vizsgálták őket, ami azt jelenti, hogy a BRAF-homológ plazmidok nem keresztreakálnak a teszt során.

A BRAF V600E mutáns plazmid 5% koncentrációban, 95% BRAF homológ plazmid jelenlétében a várt „Mutation Detected” eredményt adta valamennyi esetben, ami azt jelenti, hogy a homológ plazmidok nem zavarják a BRAF V600E mutáció kimutatását.

Bőrrel kapcsolatos mikroorganizmusok

Az alábbi bőrrel kapcsolatos mikroorganizmusokat vizsgálva, azok nem keresztreakáltak a **cobas** BRAF teszt során, amikor a szövettípus lépésben 1×10^6 telepképző egység (CFU) mennyiségben hozzáadták őket vad típusú melanoma FFPE-szövetmintához:

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

A vizsgált mikroorganizmusok nem zavarták egy 8% BRAF V600E mutációjú FFPE-szövetminta kimutatását sem, amikor a szövettípus lépésben 1×10^6 telepképző egység (CFU) mennyiségben hozzáadták őket a mintához.

Interferencia

Trigliceridek (≤ 74 mM, $2 \times$ CLSI által javasolt magas koncentráció¹⁷), hemoglobin (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ CLSI által javasolt magas koncentráció¹⁷) és $\leq 95\%$ nekrotikus szövet vizsgálatok azok nem mutattak zavaró hatást a **cobas** BRAF teszt során, amikor a potenciális zavaró anyagot hozzáadták a lízis lépéshez a minta-előkészítés folyamán.

Melanin

Az endogén melanin magas koncentrációinak hatását erősen pigmentált melanoma FFPE-szövetminták segítségével vizsgálták. Összesen 41 egyedi FFPE melanoma tumorszövet-mintát választottak ki a pigmentáltsági fokuk alapján: 33 erősen pigmentált volt, 3 afro-amerikaiból származott és 5 enyhén pigmentált volt összehasonlítás céljára. A DNS-t extrahálták a szövetből, és minden mintának meghatározták a melanin-koncentrációját. A 41 minta mindegyikéből két-két metszet készült, és az ezekből származó DNS törzsek mindegyikének egy-egy mintáját vizsgálták. Három minta érvénytelen eredményt adott. Egy minta „Mutation Not Detected” eredményt adott, de ez a minta a kimutatási határ alattiak bizonyult. Az „Invalid” eredményt adó 3 mintából a vizsgálathoz ajánlott DNS-koncentrációjú mintát készítettek, továbbá az ajánlott 125 ng/PCR DNS beviteli mennyiség kétszeres, négyszeres és nyolcszoros hígításait is. A készített hígított DNS mintákat (amelyek DNS-tartalma 125 ng,

61,5 ng, 31,25 ng, illetve 15,6 ng volt 25 µl-ben) ismételten tesztelték azért, hogy a melanin koncentráció csökkenése a hígítás során vajon lehetővé teszi-e, hogy érvényes eredmények szülessenek. Mindhárom minta már a kétszeres hígításnál helyes eredményt adott.

12. táblázat

A cobas BRAF teszt teljesítményének összefoglalása pigmentált melanoma FFPE-szövetminták esetén

Mintaazonosító	Hígítás	Melanin mennyiség a mintában/PCR	Eredmény
1	Nincs (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Kétszeres (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Négyszeres (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Nyolcszoros (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Nincs (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Kétszeres (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Négyszeres (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Nyolcszoros (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Nincs (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Kétszeres (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Négyszeres (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Nyolcszoros (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

A 17 vad típusú minta vizsgálatának eredményeiből látszik, hogy valamennyi minta helyesen „Mutation Not Detected” eredményt kapott kivéve 2 erősen pigmentált mintát, amelyek álpozitív eredményt adtak.

KLINIKAI TELJESÍTMÉNY

Reprodukálhatóság

Vizsgálatot végeztek a **cobas** BRAF teszt reprodukálhatóságára 3 külső vizsgálóhelyen (helyszínenként 2 vizsgálóval), 3 reagens tétellel 5 egymást követő napon át malignus melanoma FFPE-szövetmetszetekből származó DNS minták 8 tagú paneljével. A panel pigmentált és nem pigmentált mintákat egyaránt tartalmazott, valamint különböző százalékos tumortartalmú és mutáns allél tartalmú mintákat (egy mintát az 5%-os kimutatási határon (LoD)). A 94 futtatásból 92 (97,9%) volt érvényes. Az 1442 vizsgált mintából 2 minta (0,14%) érvénytelen eredményt adott. A LoD minták kivételével valamennyi paneltag esetén az érvényes vizsgálatok 100%-a helyes eredményt adott, beleértve a 20% mutációsintű paneltagokat és az erősen pigmentáltak minősített két paneltagot is. A LoD paneltag esetén a V600E mutációt a minták 90%-ában (162/180) sikerült kimutatni. Egyetlen vad típusú minta sem adott álpozitív eredményt. Összességében a **cobas** BRAF teszt jól reprodukálhatónak bizonyult a pigmentált és nem pigmentált minták, valamint az alacsony tumortartalmú és alacsony százalékos mutáns allél szintű minták esetén is, eltérő helyszíneken és vizsgálók által különböző reagenstételekkel más-más időpontban végzett vizsgálatok mellett egyaránt. Az analitikai specificitás 100% volt.

Referencia módszerrel való korreláció fázis III klinikai vizsgálati minták esetén

A V600E mutáció előfordulása a fázis III klinikai vizsgálatban 46,5% volt a **cobas** BRAF teszt eredmények alapján. Ez összhangban van a melanoma betegek V600E prevalenciájára vonatkozó irodalmi adatokkal.

A **cobas** BRAF teszt és a 2× bidirekcionális Sanger-féle szekvenálás teljesítményének összehasonlítására kijelöltek a vemurafenib III-as fázisú vizsgálatához szűrt egymást követő 596 beteget, és összegyűjtötték klinikai, demográfiai és Sanger-szekvenálási adataikat. Közülük 94 beteg nem volt alkalmas a beválasztási feltételek hiánya miatt, 4 betegről nem volt patológiai vélemény, 2 betegnek érvénytelen **cobas** BRAF teszteredményei voltak. A maradék vizsgálatra alkalmas 496 esetből 47 minta érvénytelen Sanger-szekvenálási eredményt adott, így 449 értékelhető eset maradt. A **cobas** BRAF teszteredmények és a Sanger-szekvenálási eredmények közti megfelelőségi vizsgálatot a V600E mutáció kimutatására az alábbi 13. táblázat mutatja.

13. táblázat

A cobas BRAF teszt és Sanger-szekvenálás eredményei összehasonlításának összefoglalása

cobas BRAF teszt (vizsgálati módszer)	Sanger-szekvenálás (referencia-módszer)		
	BRAF V600E Mutation Detected ^a	BRAF V600E Mutation Not Detected ^b	Összes
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Összes	222	227	449
Pozitív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 216 / 222 = 97,3\% (94,2\%, 98,8\%)$		
Negatív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 192 / 227 = 84,6\% (79,3\%, 88,7\%)$		
Teljes megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 408 / 449 = 90,9\% (87,8\%, 93,2\%)$		

^a „Mutation Detected” jelöli a predomináns BRAF mutáció típus, a V600E (1799 T>A) jelenlétét Sanger-módszer szerint.

^b „Mutation Not Detected” jelöli a predomináns BRAF mutáció típus, a V600E hiányát Sanger-módszer szerint (azaz mutáció nélküli vagy vad típus, V600D, V600E2, V600K, V600R és egyéb mutációk).

Megjegyzés: A **cobas** BRAF tesztel és Sanger-féle szekvenálással egyaránt érvényes eredményt adó melanoma minták.

Megjegyzés: CI = konfidenciaintervallum.

Mind a 41 mintát, amely eltérő eredményt adott **cobas** BRAF tesztel és Sanger-szekvenálással, második referencia-módszerként 454 szekvenálással (kvantitativ, masszívan párhuzamos piroszekvenálás) is megvizsgálták. Ezen kívül a **cobas** BRAF tesztel és Sanger-szekvenálással megegyező eredményt adó további 33 mintát is teszteltek 454 szekvenálással. A másodlagos megfelelési vizsgálat eredményeit az eltérő eredmények feloldása után a 14. táblázat ismerteti.

A 6 eltérő eredményt adó minta közül, amely a **cobas** BRAF tesztel „Mutation Not Detected”, Sanger-szekvenálással pedig V600E eredményt adott, 5/6 minta bizonyult vad típusnak 454 szekvenálással (egy minta érvénytelen 454-eredményt adott).

A 8/35 eltérő eredményt adó mintából, amely a **cobas** BRAF tesztel „Mutation Detected”, Sanger-szekvenálással pedig vad típus eredményt adott, 7/8 mintában 454 szekvenálással V600E mutáció volt kimutatható (egy minta érvénytelen 454-eredményt adott).

A 27/35 eltérő eredményt adó mintából, amely a **cobas** BRAF tesztel „Mutation Detected”, Sanger-szekvenálással pedig nem-V600E eredményt adott, 24 mintában V600K, egy mintában „V600E2”, egy mintában pedig V600E mutáció volt kimutatható 454 szekvenálással. Egy mintában a Sanger-féle vizsgálat V600D mutációt mutatott ki, a 454 szekvenálás pedig vad típus eredményt adott.

A **cobas** BRAF teszt során a V600K keresztreaktivitása 66% (25/38) volt.

A megfelelési arány 454 szekvenálással 100% volt azoknál a 33 V600E, illetve vad típus mintáknál, amelyek eredménye egyezett a **cobas** BRAF teszt és a Sanger-szekvenálás szerint.

14. táblázat

A cobas BRAF teszt és a Sanger-szekvenálás eredményeinek összehasonlítása az eltérő eredmények 454 szekvenálással való feloldása után

cobas BRAF teszt (vizsgálati módszer)	Az eltérő eredmények 454 szekvenálással való feloldásával után		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Összes
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Összes	225	224	449
Pozitív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 224 / 225 = 99,6\% (97,5\%, 99,9\%)$		
Negatív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 197 / 224 = 87,9\% (83,0\%, 91,6\%)$		
Teljes megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 421 / 449 = 93,8\% (91,1\%, 95,7\%)$		

BRAF 600. kodon mutációk megoszlása

A 600. kodon mutációinak megoszlását a vizsgálatra alkalmas 496 beteg mintáiban határozták meg a Sanger-módszer és a 454 szekvenálás kombinált eredményeinek alapján. A 496 mintából 182 minta vad típus, 314 minta pedig mutáns volt. A 600. kodon mutációinak megoszlását a 314 mutáció-pozitív minta közt a 15. táblázat foglalja össze. A V600K mutációt a 600. kodon mutációinak 13,4%-ában azonosították.

15. táblázat

A mutáció-pozitív népesség BRAF 600. kodon mutációinak megoszlása Sanger és/vagy 454 szekvenálással meghatározva

Aminosavsorrend (600. kodon)	Nukleotid-szekvencia (1798–1800)	N	%-os megoszlás
V600E	GAG	255	81,2
V600K	AAG	42	13,4
V600E2	GAA	13	4,1
V600R	AGG	3	1,0
V600D	GAC	1	0,3
Összes 600. kodon mutáns		314	100
Összes 600. kodon vad típus		182	---

A ZELBORAF® (vemurafenib) klinikai hatékonysága⁹

A **cobas** BRAF tesztet kiegészítő vizsgálatként használták, amikor betegeket választottak ki ZELBORAF® gyógyszerrel történő kezelésre. A ZELBORAF® klinikai biztonságosságát és hatékonyságát a NO25026 (BRIM3) vizsgálat mutatta meg, amely egy nemzetközi, nyílt, kontrollált, több helyszínű, III-as fázisú klinikai vizsgálat volt olyan korábban még nem kezelt betegek körében, akik melanómája kimetszhetetlen IIIC vagy IV-es stádiumú, és akiknél V600E BRAF mutáció van jelen. A vizsgálat célja a ZELBORAF® klinikai hatékonyságának meghatározása volt a dacarbazine-hoz képest (mértékadó terápia). A kezelésre tekintetbe vett összes melanomabeteget FFPE-szövetmintáját vizsgálták a **cobas** BRAF tesztel. A „Mutation Detected” teszteredményű betegek vehettek részt a gyógyszervizsgálatban, amennyiben megfeleltek az egyéb besorolási követelményeknek is. A „Mutation Not Detected” teszteredményű betegek nem vehettek részt a gyógyszervizsgálatban. A vizsgálatot világszerte mintegy 104 helyszínen végezték (az USA-ban 22 központban).

A vizsgálatban 675 beteg vett részt, akik közül 337-en vemurafenib-, 338-an pedig dacarbazine-kezelést kaptak. A vizsgálat hatásosság szempontjából legfontosabb eredményeként meghatározták a teljes túlélés (*Overall Survival* – OS) és a vizsgálat által megállapított progressziómentes túlélés (*Progression-Free Survival* – PFS) mérőszámait. Eredményességi mérőszámként meghatározták a vizsgálat által megállapított legjobb teljes reakcióarányt is.

A betegek alapvető jellemzői kiegyensúlyozottak voltak a kezelési csoportok között. A legtöbb beteg férfi volt (56%) és európai (99%), az életkor középértéke 54 év volt (24% ≥ 65 éves volt), minden beteg ECOG teljesítményszátusza 0 vagy 1 volt, és a betegek többségének áttétképző volt a betegsége (95%).

A vizsgálat hatékonysági eredményeit az alábbi 16. táblázat és 2. ábra mutatja.

16. táblázat

A vemurafenib hatékonysága korábban még nem kezelt, BRAFV600E mutációra pozitív melanómában szenvedő betegeknél^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dacarbazine (N = 338)	p érték ^d
Teljes túlélés			
Halálozások száma	78 (23%)	121 (36%)	-
Kockázati arány (95% CI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Túlélés középértéke (hónap) (95% CI) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Betegkövetési idő középértéke (hónap) (tartomány)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Progressziómentes túlélés kockázati arány (95% CI) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
PFS középértéke (hónap) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a A **cobas** BRAF teszt eredménye szerint

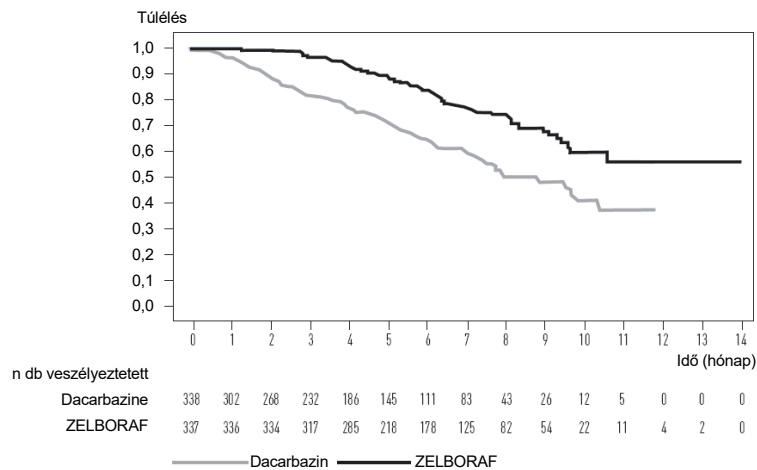
^b A kockázati arány becslése a Cox-modell alapján; a < 1-es kockázati arány szerint a vemurafenib kedvező

^c Kaplan-Meier becslés

^d Logaritmikus besorolású nem rétegzett teszt

^e Nem érte el

2. ábra
A még nem kezelt betegek teljes túlélésének Kaplan-Meier görbéi



A megerősített, vizsgálók által megállapított legjobb teljes reakcióarány 48,4% volt (95% CI: 41,6%, 55,2%) a ZELBORAF® ágban, és 5,5% (95% CI: 2,8%, 9,3%) a dacarbazine ágban.

A COTELLIC® (cobimetinib) klinikai hatékonysága^{10, 11}

A COTELLIC® MEK-inhibitor és a ZELBORAF® együttes használatát klinikai vizsgálatban (coBRIM) hasonlították össze a ZELBORAF® és egy placebo kombinációjával. A **cobas** BRAF teszttel határozták meg, hogy a betegek részt vehetnek-e ebben a klinikai vizsgálatban. A COTELLIC® és a ZELBORAF® együttes használatának biztonságosságát és hatékonyságát több helyszínrő, randomizált (1:1), kettős vak placebo-kontrollált vizsgálatban állapították meg, amelyet 495 olyan beteg körében végeztek, akiket korábban még nem kezeltek a BRAF V600 mutációra pozitív kimetszhetetlen vagy áttétképző melanomájuk miatt. A hatásosság szempontjából legfontosabb eredmény a vizsgálók által megállapított progressziómentes túlélés (*Progression-Free Survival – PFS*) értéke volt RECIST v1.1 szerint. További hatékonysági eredmény volt a vizsgálók által megállapított megerősített objektív reakcióarány (*Objective Response Rate – ORR*), a teljes túlélés (*Overall Survival – OS*), a vak, független központi felülvizsgálat által megállapított PFS és a reakció időtartama (*Duration of Response – DOR*).

A betegek alapvető jellemzői kiegyensúlyozottak voltak a kezelési csoportok között. A legtöbb beteg férfi volt (58%) és europid (93%), az életkor középértéke 55 év volt, a betegek 72%-ának ECOG teljesítménystátusza 0 volt, és a betegek 60%-ának M1c stádiumú volt a betegsége.

A kezelésre tekintetbe vett összes beteg FFPE-szövetmintáját vizsgálták a **cobas** BRAF teszttel. A „Mutation Detected” eredményű betegek vehettek részt a vizsgálatban, amennyiben megfeleltek az egyéb besorolási követelményeknek is. A „No Mutation Detected” eredményű betegek nem vehettek részt a vizsgálatban. A vizsgálatban azok a betegek vettek részt, akiknél a **cobas** BRAF teszt BRAF V600K mutációt mutatott ki, ami a termék terápiás biztonságosságát és hatékonyságát mutatja a V600K-tartalmú daganattal rendelkező betegpopulációnak a teszt által meghatározott részében.

A vizsgálat hatékonysági eredményeit az alábbi 17. táblázat és 3. ábra mutatja.

17. táblázat
A cobimentinib és vemurafenib együttes alkalmazásának hatékonysága
BRAF mutációra pozitív melanomában szenvedő betegeknél^a

	Cobimentinib + vemurafenib (N = 247)	Placebo + vemurafenib (N = 248)	p érték
Progressziómentes túlélés (vizsgálók által megállapított)			
Események száma (%)	143 (58%)	180 (73%)	
Progresszió	131	169	
Halál	12	11	
PFS középértéke (hónap) (95% CI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Kockázati arány (95% CI) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Teljes túlélés			
Halálesetek száma (%)	79 (32%)	109 (44%)	
Túlélés középértéke (hónap) (95% CI) ^c	Nem becsülhető (20,7, nem becsülhető)	17,0 (15,0, nem becsülhető)	-
Kockázati arány (95% CI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektív reakcióarány			
Objektív reakcióarány (95% CI) ^c	70% (64%, 75%)	50% (44%, 56%)	< 0,001
Teljes reakció	16%	10%	
Részleges reakció	54%	40%	
Reakció időtartamának középértéke, hónap (95% CI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a A **cobas** BRAF teszt eredménye szerint

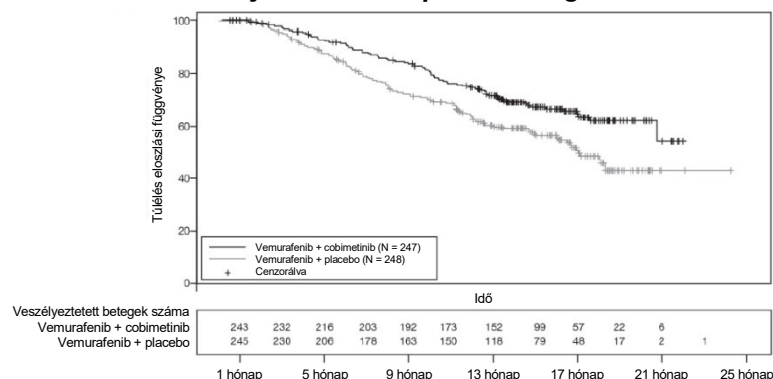
^b A kockázati arány becslése a Cox-modell alapján; a < 1-es kockázati arány szerint a cobimentinib + vemurafenib kedvező

^c Kaplan-Meier becslés

^d Logaritmusos besorolású rétegzett teszt

^e Statisztikai szignifikánság attól függően, hogyan viszonyul a 0,019-es kijelölt alfa érték ennél a közbenső elemzésnél

3. ábra
A teljes túlélés Kaplan-Meier görbéi



A randomizált betegektől származó rendelkezésre álló tumormintákat visszamenőlegesen elemezték új generációs szekvenálással (*Next Generation Sequencing* – NGS), hogy a BRAF mutációkat továbbosztályozzák V600E és V600K kategóriákba. A teszteredményeket a randomizált betegek 81%-ától szerezték be (400/495). Azon betegek körében, akiknél az NGS sikeres volt, a 400 beteg közül 56 (14%) tumorában voltak BRAF V600K mutációk, a többi beteg tumorában pedig BRAF V600E mutációkat találtak. Annál az 56 tumornál, amelyekről visszamenőlegesen megállapították, hogy BRAF V600K mutáció van jelen, a mutációk gyakorisága 5,1 és 36,6% között volt ebben az elemzésben. A cobimentinib és vemurafenib kombinációját használó ágat előnyben részesítő trend volt megfigyelhető a PFS, OS és ORR értékeket vizsgáló alcsoportelemzésekben a BRAF V600 mutáció altípusaira a vizsgálat betegeinek 81%-ánál a BRAF V600 mutációtípusok meghatározásakor.

II. PAPILLARIS PAJZSMIRIGYCARCINOMA (PTC)

NEM KLINIKAI ÉRTÉKELÉS

Az alább ismertetett nem klinikai vizsgálatok során az olyan tumor olyan jellemzőit, mint a %-os tumor tartalom, patológiai vizsgálattal értékelték. A mintákat bidirekcionális Sanger-féle szekvenálással választották ki vizsgálatra. A mutáció százalékos szintjét 454 szekvenálás (kvantitatív, masszívan párhuzamos piroszekvenálási módszer) segítségével határozták meg.

Analitikai érzékenység

Analitikai érzékenység – Kimutatási határ (LoD)

A bevitt DNS minimális mennyiségét, amely az esetek 95%-ában helyes eredményt ad, két mintatípusból készített hígítási panelek segítségével vizsgálták:

- Mintakeverékek, amelyeket BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintákból és BRAF vad típus FFPE-szövetmintákból származó DNS törzsek összekeverésével készítettek adott mutációszinteknek megfelelően.
- Egyéni FFPET DNS törzsek, amelyeket két BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintából készítettek.

Hogy meghatározzák az egyes minták százalékos mutációját, a vizsgálatban használt valamennyi mintát 454 szekvenálással szekvenálták.

Analitikai érzékenység mintakeverék segítségével

BRAF V600E mutáns FFPE-szövetminta DNS törzseket úgy keverték BRAF vad típus FFPE-szövetminta DNS törzsekkel, hogy egy minta ~10%, egy ~5% és egy minta ~2% mutációszinten legyen. Az összekeverést követően a mutációszinteket 454 szekvenálással ellenőrizték. A három, V600E mutációt tartalmazó mintakeveréket felhígították, hogy a 18. táblázat részletezett panel tagjait kapják.

18. táblázat
Hígítási panel tagok készítése mintakeverékből

Keverék	Átlag % mutáció*	DNS mennyiség hígítási panel tagokban (ng/25 µl)**
10% keverék	10%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5% keverék	5%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5% keverék	2%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0% (csak vad típus)	- - -	125

* A keverék átlagos százalékos mutációtartalma 454 szekvenálással.

** Az egyes paneltagok genomi DNS tartalma. 25 µl a minta beviteli térfogat a teszt során.

Minden paneltag nyolc-nyolc (8) ismétlését futtatták **cobas** BRAF tesztkészlet 3 gyártási tételének mindegyikével (n = 24/paneltag). A 19. táblázat az egyes FFPE mintakeverékek érzékenységét mutatja, amelyet úgy határoztak meg, mint az a legkisebb DNS mennyiség, amely legalább 95%-ban BRAF V600E „Mutation Detected” eredményt ad (szürkén kiemelt sorok).

19. táblázat
A cobas BRAF teszt érzékenysége FFPE-szövetmintakeverékekkel

FFPE-szövetkeverék	Százalékos mutáció 454 szekvenálással	DNS mennyiség a paneltagban	„Mutation Detected” arány (n = 24)
10% FFPE-szövetkeverék	10%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	100%
		0,5 ng/25 µl	92%
		0,2 ng/25 µl	83%
		0,1 ng/25 µl	29%
5% FFPE-szövetkeverék	5%	125 ng/25 µl	96%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	83%
		0,5 ng/25 µl	54%
		0,2 ng/25 µl	67%
		0,1 ng/25 µl	25%
2,5% FFPE-szövetkeverék	2%	125 ng/25 µl	0%
		41,7 ng/25 µl	0%
		13,9 ng/25 µl	4%
		4,6 ng/25 µl	21%
		1,5 ng/25 µl	21%
		0,5 ng/25 µl	33%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%
0% (vad típus)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Ez a vizsgálat megmutatja, hogy a **cobas** BRAF teszt képes a BRAF V600E mutáció kimutatására $\geq 5\%$ mutációs szintnél a standard 125 ng/25 µl bevitt DNS mennyiség mellett. A teszt képes alacsonyabb bevitt DNS szintek mellett is a mutáció kimutatására, ami azt jelenti, hogy bár a minták a fixálási eljárás következtében degradált DNS-t tartalmazhatnak, mégis kimutatható marad a mutáció. A BRAF vad típus minta esetén végzett valamennyi vizsgálat „Mutation Not Detected” eredményt adott.

Analitikai érzékenység FFPE-szövetminták segítségével

Az 5%-os mutáció-kimutatói képesség igazolására betegmintákban a következő vizsgálatot végezték: két BRAF V600E mutáns FFPE-szövetmintából készült huszonnégyszer egyéni, 6%, illetve 11% mutációs szintű 5 µm-es metszetet dolgoztak fel egyenként úgy, hogy a DNS izoláláshoz **cobas**® DNA Sample Preparation Kit 3 gyártási tételét használták. Minden metszet DNS-éből sorozathígítás készült: egy 8 paneltagból álló sorozat (részletek a 20. táblázat).

20. táblázat
Hígítási panel tagok készítése FFPE-szövetmintából

	Átlag % V600E mutáció*	DNS mennyiség hígítási panel tagokban (ng/25 µl)
Minta 1	6%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Minta 2	11%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* A minta átlagos százalékos mutációtartalma 454 szekvenálással.

Minden paneltag nyolc-nyolc (8) ismétlését futtatták **cobas** BRAF tesztkészlet 3 gyártási tételének mindegyikével (n = 24/paneltag). Az egyes FFPE-szövetminták esetén az érzékenységet úgy határozták meg, mint az a legkisebb DNS mennyiség, amely legalább 95%-ban BRAF V600E „Mutation Detected” eredményt ad (szürkén kiemelt sorok). A vizsgálat eredményei a 21. táblázat láthatóak.

21. táblázat
A cobas BRAF teszt érzékenysége FFPE-szövetminták segítségével

FFPE-szövetminta	Százalékos mutáció 454 szekvenálással	DNS mennyiség a paneltagban	„Mutation Detected” arány (n = 48)
Minta 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	83%
		1,5 ng/25 µl	71%
		0,5 ng/25 µl	29%
		0,2 ng/25 µl	17%
		0,1 ng/25 µl	0%
Minta 2	11%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	71%
		1,5 ng/25 µl	46%
		0,5 ng/25 µl	17%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%

Ez a vizsgálat megmutatta, hogy a **cobas** BRAF teszt képes a BRAF V600E mutáció kimutatására konkrét klinikai FFPE-szövetmintákban $\geq 5\%$ mutációs szintnél a standard 125 ng/25 µl bevitt DNS mennyiség mellett. A teszt képes alacsonyabb bevitt DNS szintek mellett is a mutáció kimutatására, ami azt jelenti, hogy bár a minták a fixálási eljárás következtében degradált DNS-t tartalmazhatnak, mégis kimutatható marad a mutáció.

Ismételhetőség

Vizsgálatot végeztek a **cobas** BRAF teszt ismételhetőségére két kezelővel, két reagenstétellel, négy egymást követő napon át öt papillaris pajzsmirigy-carcinoma FFPE-szövetmintából. Ezen FFPE-szövetminták a 50–70% közötti tartományban tartalmaztak tumorszövetet, valamint a 16–22% közötti tartományban mutáns allélokot, beleértve két V600E mutáns mintát is ~16–18% mutációs aránnyal (a kimutatási határ ~3×-osa). A helyes eredmények aránya a vizsgált mintáknál 100% volt (80/80). Egyetlen vad típusú minta sem adott álpozitív eredményt. Összességében a **cobas** BRAF teszt jól ismételhetőnek bizonyult az alacsony tumortartalmú és alacsony százalékos mutánsallél-szintű minták esetén, eltérő kezelők által különböző reagenstételekkel más-más időpontban végzett vizsgálatok mellett.

Korreláció referenciamódszerrel

A **cobas** BRAF teszt és a 2× bidirekcionális Sanger-szekvenálás teljesítményének összehasonlítására 159 PTC FFPE-szövetmintáról gyűjtötték a Sanger-szekvenálás adatait. A **cobas** BRAF teszteredmények és a Sanger-szekvenálási eredmények közti elsődleges megfeleléségi vizsgálatot a V600E mutáció kimutatására a 22. táblázat mutatja (a két vizsgált gyártási tétel közül az egyikre). A második gyártási tételnél hasonló eredmények születtek egy minta kivételével, amely „Mutation Not Detected” eredményt adott. A 454 szekvenálással történt feloldás szerint a minta 1,4%-ban tartalmazott mutációt, és a **cobas** BRAF teszt 5%-os érzékenységi küszöbe alatt volt.

22. táblázat

A cobas BRAF teszt és Sanger-szekvenálás eredményei összehasonlításának összefoglalása

cobas BRAF teszt (vizsgálati módszer)	Sanger-szekvenálás (referencia-módszer)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	Összes
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Összes	89	70	159
Pozitív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 88 / 89 = 98,9\%$ (93,9%, 99,8%)		
Negatív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 57 / 70 = 81,4\%$ (70,8%, 88,8%)		
Teljes megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 145 / 159 = 91,2\%$ (85,8%, 94,7%)		

^a „Mutation Detected” jelöli a predomináns BRAF mutáció típus, a V600E (1799 T>A) jelenlétét Sanger-módszer szerint.

^b „Mutation Not Detected” jelöli a predomináns BRAF mutáció típus, a V600E hiányát Sanger-módszer szerint (azaz mutáció nélküli vagy vad típus és egyéb mutációk).

Megjegyzés: CI = konfidenciaintervallum.

Minden mintát, amely eltérő eredményt adott **cobas** BRAF tesztel és Sanger-szekvenálással, második referencia-módszerként 454 szekvenálással (kvantitatív, masszívan párhuzamos piroszekvenálás) is megvizsgálták. A másodlagos megfelelési vizsgálat eredményeit az eltérő eredmények feloldása után a 23. táblázat ismerteti.

Egy eltérő eredményt adó mintának a **cobas** BRAF tesztel „Mutation Not Detected” eredménye, Sanger-féle szekvenálással pedig „V600E” eredménye volt, a 454 szekvenálás pedig vad típusú eredményt adott összhangban a **cobas** BRAF teszt eredményével.

A tizenhárom eltérő eredményt adó mintából, amelyek **cobas** BRAF tesztel „Mutation Detected”, Sanger-féle szekvenálással pedig vad típusú eredményt adtak, tizenkettőnél 454 szekvenálással V600E mutáció volt kimutatható (1,2–19% allélgyakoriság), összhangban a **cobas** BRAF teszt eredményeivel.

Az egyetlen eltérő eredményt adó minta, mely V600E-re Mutation Detected eredményt adott **cobas** BRAF tesztel, Sanger-féle és 454 szekvenálással is vad típusú eredményt adott. Egy újabb 454 szekvenálás során később bebizonyosodott, hogy a minta alacsony százalékban tartalmaz V600E mutációt.

23. táblázat

A cobas BRAF teszt és a Sanger-szekvenálás eredményeinek összehasonlítása az eltérő eredmények 454 szekvenálással való feloldása után

cobas BRAF teszt (vizsgálati módszer)	Sanger-féle szekvenálás az eltérő eredmények 454 szekvenálással való feloldásával		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Összes
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Összes	101	58	159
Pozitív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 101 / 101 = 100,0\%$ (96,3%, 100,0%)		
Negatív megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 57 / 58 = 98,3\%$ (90,9%, 99,7%)		
Teljes megfelelési arány (95% CI)	$100\% \times 158 / 159 = 99,4\%$ (96,5%, 99,9%)		

EREDMÉNYJELZŐK LISTÁJA

A „Results” lapon eredményjelzőket talál. A jelzők forrását az alábbi 24. táblázatban látható módon a jelzők kódja tartalmazza. A 25. táblázat a felhasználó számára releváns minden értelmezési jelzőt tartalmaz.

24. táblázat
Jelző forrása

A jelzőkód első betűje	Jelző forrása	Példa
M*	Több vagy egyéb ok	M6
R	Az eredmény értelmezése	R200
Z*	Analizátor	Z1

* A további részleteket a cobas® 4800 rendszer felhasználói kézikönyvében vagy a cobas® 4800 rendszer felhasználói segédletében találja

25. táblázat
Eredményértelmezési jelzők listája

Jelzőkód	Súlyosság	Leírás	Javasolt teendő
R200	Hiba	Érvénytelen mutánskontroll.	Ismételje meg a futtatást a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód a következőket jelentheti: 1. A mutánskontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez DNS-szennyeződés esetén történhet, vagy ha atipikus fluoreszcencia-mintázat miatt az algoritmus hibás eredményt ad; vagy 2. A mutánskontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték felett volt (azaz a könyök túl magas). Ez akkor fordulhat elő, ha 1) a Master Mix munkareagenst nem megfelelően készítették el, 2) pipettázási hiba történt, amikor a Master Mix munkareagenst a mikrolemez reakciólukába tették, vagy 3) pipettázási hiba történt, amikor a mutánskontrollt a mikrolemez reakciólukába tették.
R201	Hiba	A vad típusú kontroll érvénytelen.	Ismételje meg a futtatást a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód a következőket jelentheti: 1. A vad típusú kontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez DNS-szennyeződés esetén történhet, vagy ha atipikus fluoreszcencia-mintázat miatt az algoritmus hibás eredményt ad; vagy 2. A vad típusú kontroll egy megfigyelt könyökértéke a meghatározott küszöbérték felett volt (azaz a könyök túl magas). Ez akkor fordulhat elő, ha 1) a Master Mix munkareagenst nem megfelelően készítették el, 2) pipettázási hiba történt, amikor a Master Mix munkareagenst a mikrolemez reakciólukába tették, vagy 3) pipettázási hiba történt, amikor a vad típusú kontrollt a mikrolemez reakciólukába tették.
R202	Hiba	A mutánskontroll nem mutatható ki.	Ismételje meg a minta tesztelését a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód azt jelzi, hogy a teszt szerint a mintának nem volt mutációra jellemző könyökértéke. Ez vagy azt jelenti, hogy a mintában nem volt mutáció, vagy a következő okok közül egyet vagy többet. 1. Kicsi a teszt kimutatási határa alatti mutáns szekvenciák aránya. 2. Rossz minőségű genomiális DNS a mintában. 3. Elégtelen mintafeldolgozás. 4. PCR-inhibitorok jelenléte a mintában. 5. Ritka mutációk a primerek és/vagy mutáns próba által lefedett genomiális DNS régióiban. 6. Mintapipettázási hiba, vagy a minta DNS-ét nem helyezték a reakciólukába.

Jelzőkód	Súlyosság	Leírás	Javasolt teendő
R203	Hiba	A vad típusú kontroll nem mutatható ki.	Ismételje meg a minta tesztelését a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód azt jelzi, hogy a teszt szerint a mintának nem volt vad típusra jellemző könyökértéke. A vad típusra jellemző könyökérték hiánya a következő okok közül egynek vagy többnek a fennállására utalhat. 1. Rossz minőségű genomiális DNS a mintában. 2. Elégtelen mintafeldolgozás. 3. PCR-inhibitorok jelenléte a mintában. 4. Ritka mutációk a primerek és/vagy vad típusú próba által lefedett genomiális DNS régióiban. 5. Lehetséges, hogy egy vagy több lyukba nem adagoltak minta-DNS-t.
R204	Hiba	A mutánskontroll a tartományon kívül van.	Ismételje meg a minta tesztelését a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód a következőket jelentheti: 1. A minta egy megfigyelt mutáns könyökértéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez akkor fordulhat elő, ha a PCR-elegy jelentősen túlterhelt koncentrált genomi DNS-sel, vagy ha atipikus fluoreszcencia-mintázat miatt az algoritmus hibás eredményt ad; vagy 2. A minta egy megfigyelt mutáns könyökértéke a meghatározott küszöbérték fölött volt (azaz a könyök túl magas). Ez a következő okok közül egy vagy több fennállását jelentheti. • Kicsi a teszt kimutatási határa alatti mutáns szekvenciák aránya. • Pipettázási hiba történt, amikor a minta DNS-ét a reakciólyukba helyezték. • Rossz minőségű genomiális DNS a mintában. • Elégtelen mintafeldolgozás. • PCR-inhibitorok jelenléte a mintában. • Ritka mutációk a primerek és/vagy mutáns próba által lefedett genomiális DNS régióiban.
R205	Hiba	A vad típusú kontroll tartományon kívül van.	Ismételje meg a minta tesztelését a teszt leírása szerint. Ez a jelzőkód a következőket jelentheti: 1. A minta egy megfigyelt vad típusú könyökértéke a meghatározott küszöbérték alatt volt (azaz a könyök túl alacsony). Ez akkor fordulhat elő, ha a PCR-elegy jelentősen túlterhelt koncentrált genomi DNS-sel, vagy ha atipikus fluoreszcencia-mintázat miatt az algoritmus hibás eredményt ad; vagy 2. A minta egy megfigyelt vad típusú könyökértéke a meghatározott küszöbérték fölött volt (azaz a könyök túl magas). Ez a következő okok közül egy vagy több fennállását jelentheti. • Pipettázási hiba történt, amikor a minta DNS-ét a reakciólyukba helyezték. • Rossz minőségű genomiális DNS a mintában. • Elégtelen mintafeldolgozás. • PCR-inhibitorok jelenléte a mintában. • Ritka mutációk a primerek és/vagy vad típusú próba által lefedett genomiális DNS régióiban.

HIVATKOZÁSOK

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

Dokumentum verzióinformációi	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Frissített részek: FELHASZNÁLÁS MÓDJA és A VIZSGÁLAT ÖSSZEGZÉSE ÉS MAGYARÁZATA. Új részek: A ZELBORAF® (vemurafenib) klinikai hatékonysága és A COTELLIC® (cobimetinib) klinikai hatékonysága. Kiegészítve a tárgylemez stabilitási adatával a MINTA LEVÉTELE, SZÁLLÍTÁSA ÉS TÁROLÁSA részben. Kiegészítve a melaninról szóló állítással az ELJÁRÁSSAL KAPCSOLATOS KORLÁTOZÁSOK részben. Új általános nyelvi frissítések a jobb érthetőség és a cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test US-IVD használati útmutatójával való összhang céljából. Esetleges kérdésével forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.
11/2019	„FFFPET” rövidítés javítása „FFPET”-re, és a „nagyobb vagy egyenlő” jel javítása a PDF megfelelő elrendezéséhez (24. oldal). A harmonizált szimbólumok oldala frissítve. Esetleges kérdésével forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.
Doc Rev. 11.0 06/2020	A DNS minta-előkészítő készlet következő adatai eltávolítva: • Reagensok felsorolása és összetétele • Ezekhez kapcsolódó eljáráslépések és megjegyzések Új hivatkozás a cobas® DNA Sample Preparation Kit használati útmutatójára „Az eljárással kapcsolatos korlátozások” részben. A rendszer kézikönyvére és a felhasználói kézikönyvre való hivatkozások cseréje erre: „cobas® 4800 rendszer felhasználói kézikönyve vagy a cobas® 4800 rendszer felhasználói segédlete”. Az egész dokumentumban javítottuk a betűhibákat, és következetesebb nyelvezetet vezettünk be, valamint a dokumentumot konzisztensebbé tettük az USA-beli használati útmutatóval. Új eredményjelzők. Frissített hivatkozás a Nemzetközi Légi Szállítási Szövetségre. A harmonizált szimbólumok oldala, a védjegyekre és szabadalmakra vonatkozó rész és a viszonteladók címei frissítve. Új nyilatkozat arról, hogy a termék biztonsági címkézése elsősorban az EU GHS irányelveket követi. Esetleges kérdésével forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

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
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Védjegyek és szabadalmak

A COBAS, a COBAS Z és az AMPERASE a Roche védjegye.

Valamennyi egyéb terméknév és védjegy az adott tulajdonosok tulajdona.

Az AmpErase enzim átvitelmegelőző technológiáját az 7,687,247 USA szabadalom védi, amelynek tulajdonosa a Life Technologies, licensztulajdonosa pedig a Roche Molecular Systems, Inc.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-09



A Roche PCR diagnosztikai termékeket a következő szimbólumok jelölik.



Segédsoftver



Lotszám



Meghatalmazott képviselő
az Európai Közösségben



Biológiai veszély



Vonalkód adatlap



Katalógusszám



Olvassa el a használati útmutatót



Csak IVD teljesítmény értékelésre



Tartalma <n> vizsgálathoz elegendő



Megadott tartomány alsó határa



A csomag tartalma



Gyártó



Forgalmazó



Sötétben tárolandó



In vitro diagnosztikai felhasználásra



Hőmérsékletkorlát



Vizsgálatdefiníciós fájl



Lejárat dátuma



Megadott tartomány felső határa

Rx Only

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



Globális kereskedelmi cikkszám



Gyártás napja



CE megfelelési jelzés: ez az eszköz megfelel az *in vitro* diagnosztikai felhasználású orvostechnikai eszközök CE jelölésére vonatkozó előírásoknak.

Felhasználói technikai segítségnyújtás az Egyesült Államokban 1-800-526-1247