

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test



PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Consulte el **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) para obtener información sobre la preparación de las muestras.

USO PREVISTO

El uso principal de la prueba **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation es la detección de las mutaciones V600 en BRAF en ADN extraído de tejido melánico y con carcinoma papilar de tiroides (CPT) humano fijado en formol e impregnado en parafina. En el caso del melanoma, esta prueba está diseñada para utilizarse como ayuda en la selección de pacientes cuyos tumores portan las mutaciones V600 en BRAF para su tratamiento con ZELBORAF[®] (vemurafenib) en exclusiva o mediante la combinación de COTELLIC[®] (cobimetinib) y ZELBORAF[®] (vemurafenib).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La activación de las mutaciones en el protooncogén BRAF se produce en numerosos cánceres humanos, como el melanoma maligno, el cáncer colorrectal, el cáncer ovárico y el cáncer tiroideo.^{1, 2} Se han identificado mutaciones en BRAF en el 40-60 % de los melanomas malignos³ y en el 36-46 % de los carcinomas papilares de tiroides.^{4, 5} Las mutaciones en BRAF también son comunes en los nevi benignos⁶, lo que sugiere que este tipo de mutaciones se producen de forma muy temprana. El descubrimiento de estas mutaciones somáticas en el gen BRAF en melanomas, CPT y otros tumores humanos ha ayudado a dilucidar la función esencial de la cinasa BRAF en la señalización de vías que controlan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. En las células normales, el gen BRAF forma parte de una vía de señalización muy regulada que interviene en los efectos de los receptores del factor de crecimiento (como el EGFR) a través de las vías RAS, RAF, MEK y ERK. Las mutaciones oncogénicas en el gen BRAF resultan en una ganancia de la función de la cinasa, con lo que la vía RAF-MEK-ERK se presenta como constitutivamente activa en ausencia de los factores de crecimiento típicos.

La mayoría de las mutaciones en BRAF de melanoma, CPT y otros tumores humanos se producen en el codón 600.⁷ La mutación predominante en el codón 600 es la mutación V600E (GTG > GAG). También se han observado, aunque de forma menos común, una serie de mutaciones dinucleotídicas que afectan al codón 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) y V600D (GTG > GAT)], principalmente en los melanomas y, con menor frecuencia, en otros tumores, como el cáncer colorrectal.

La prueba **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation es un ensayo de PCR a tiempo real diseñado para detectar la presencia de la mutación V600E (T1799A). La prueba **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation se utiliza como complemento diagnóstico para vemurafenib, un fármaco que inhibe la mutación V600E en BRAF. Los ensayos clínicos de vemurafenib en pacientes con melanoma avanzado han demostrado que los pacientes que presentan un tumor con mutación V600E pueden experimentar beneficios clínicos derivados del fármaco.^{8, 9} Posteriormente, un ensayo clínico de cobimetinib en combinación con vemurafenib en pacientes con melanoma avanzado ha demostrado que los pacientes con un tumor que presenta la mutación V600E o V600K detectada mediante la prueba **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation tienen posibilidades de experimentar beneficios clínicos derivados del tratamiento.^{10, 11} La mutación V600K está presente en aproximadamente el 10-15 % de las muestras de melanoma con mutaciones V600 en BRAF.¹²

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation (prueba **cobas** BRAF) se basa en dos procesos: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN genómico a partir de tejido impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET) y (2) amplificación y detección del ADN diana mediante PCR y un par de cebadores (primers) complementarios y dos sondas oligonucleótidas con distintos marcadores fluorescentes. Una de las sondas se ha diseñado para detectar la secuencia BRAF V600 no mutada y la otra, para detectar la secuencia de la mutación V600E. También se incluyen dos controles externos para la serie y el alelo no mutado se utiliza como control interno para todo el proceso.

Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras de FFPET y el aislamiento del ADN se lleva a cabo mediante el **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras basada en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. A continuación se realiza la lisis de una sección de 5 µm desparafinada de una muestra de FFPET mediante su incubación a una temperatura elevada con una proteasa y un buffer de lisis/unión caotrópico que liberan ácidos nucleicos y protegen el ADN genómico que liberan las DNasas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN genómico se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos celulares, se eliminan mediante centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. La cantidad de ADN genómico se determina espectrofotométricamente y se ajusta según una concentración establecida para añadirse a la mezcla de amplificación y detección. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN de la diana en el **cobas z** 480 analyzer mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba **cobas** BRAF.

Amplificación y detección mediante PCR

Selección de la diana

La prueba **cobas** BRAF utiliza cebadores que definen una secuencia de 116 pares de bases del ADN genómico humano que contiene el codón 600 en el exón 15 del gen BRAF. No se amplifica el gen BRAF por completo. La prueba **cobas** BRAF está diseñada para detectar el cambio T>A del nucleótido 1799 en el gen BRAF, que conlleva una sustitución de valina por ácido glutámico en el codón 600 (V600E). Las sondas TaqMan con marcadores fluorescentes para la diana de ADN específica de BRAF no mutado y mutado se unen a las secuencias no mutadas y mutadas, respectivamente. Las secuencias no mutadas y mutadas se detectan mediante un canal óptico específico para cada secuencia.

Amplificación de la diana

Para la amplificación de la diana se utiliza la ADN polimerasa Z05 de la cepa Thermus. En primer lugar, se calienta la mezcla de reacción de la PCR para desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias de la diana del cebador. A medida que se enfría la mezcla, los cebadores que van en un sentido y en sentido contrario se hibridan con las secuencias del ADN diana. La ADN polimerasa Z05, en presencia de metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores hibridados, lo que conlleva la síntesis con una segunda cadena de ADN. Con esto se completa el primer ciclo de la PCR, que da lugar a una copia de ADN bicatenario de la región de la diana de 116 pares de bases del gen BRAF. Este proceso se repite un número determinado de ciclos, en cada uno de los cuales se duplica el volumen de ADN del amplicón. La amplificación solo se produce en la región del gen BRAF situada entre los cebadores.

Detección en tiempo real automatizada

La prueba **cobas** BRAF utiliza la tecnología de la PCR a tiempo real. Cada sonda oligonucleótida específica para una diana de la reacción se marca con un marcador fluorescente que actúa como emisor (reporter) y una molécula silenciadora (quencher) que absorbe las emisiones de fluorescencia del marcador emisor de una sonda intacta. Durante cada ciclo de amplificación, la sonda complementaria se une a la secuencia de ADN monocatenaria del amplicón y, posteriormente, se escinde por la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05. Una vez que el marcador emisor se separa del silenciador por la actividad de la nucleasa, es posible medir la fluorescencia con una longitud de onda característica cuando el marcador emisor se excita con el espectro lumínico adecuado. Se utilizan dos marcadores emisores distintos para marcar la sonda específica de la diana de la secuencia de BRAF no mutada (WT) y la sonda para la diana de la mutación V600E en BRAF. La amplificación de las dos secuencias BRAF puede detectarse de forma independiente en un único pocillo de reacción si se mide la fluorescencia en las dos longitudes de onda definidas de los canales ópticos dedicados.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos de la diana de la muestra se lleva a cabo mediante la prueba **cobas** BRAF gracias a la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y al trifosfato de desoxiuridina (dUTP).¹³ La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no de cadenas que contienen timidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de dUTP como uno de los trifosfatos del nucleótido en el reactivo de la mezcla de reacción; por lo tanto, solo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de realizar la amplificación del ADN de la diana. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de la mezcla de reacción, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina mediante la apertura de la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta durante el primer paso del ciclo térmico hasta un nivel pH alcalino, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos del ciclo térmico y, por consiguiente, no es capaz de destruir el amplicón de la diana.

REACTIVOS

cobas [®] 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 pruebas (M/N: 05985595190)			
Componentes del kit	Composición del reactivo	Cantidad por kit	Símbolo de seguridad y advertencia ^a
RXNMIX (Mezcla de reacción)	Buffer Tricina Acetato de potasio Hidróxido potásico Glicerol Tween 20 EDTA 5 % de sulfóxido de dimetilo < 0,09 % de dNTP < 0,10 % de ADN polimerasa Z05 (microbiana) < 0,10 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,003 % de aptámero oligonucleótido 0,08 % de azida sódica	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (Acetato de magnesio)	Acetato de magnesio 0,09 % de azida sódica	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (Mezcla de oligonucleótidos BRAF)	Buffer Tris-HCl EDTA 0,09 % de azida sódica ARN poli Ar (sintético) < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente BRAF < 0,01 % de sondas BRAF con marcador fluorescente	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (Control de mutación en BRAF)	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,001 % de ADN plasmídico (microbiano) con secuencia BRAF mutada < 0,001 % de ADN plasmídico (microbiano) con secuencia BRAF no mutada	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (Control de BRAF no mutado)	Buffer Tris-HCl EDTA ARN poli Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,001 % de ADN plasmídico (microbiano) con secuencia BRAF no mutada	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (Diluyente para muestras de ADN)	Buffer Tris-HCl 0,09 % de azida sódica	2 × 1 ml	N/A

^a Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

A. PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

- B. Esta prueba debe utilizarse con muestras de tejido impregnado en parafina y fijado en formalina.
- C. No pipetee con la boca.
- D. No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- E. Evite la contaminación microbiana y del ADN de los reactivos.
- F. Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.
- G. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- H. No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- I. Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- J. Es preciso el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos **cobas**[®] 4800 para evitar la contaminación.
- K. Para evitar la contaminación de la Master Mix de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito* de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %.

*** NOTA: la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.**

- L. Las muestras deben tratarse como material infeccioso y, como tal, deben aplicarse los procedimientos de seguridad de laboratorio descritos en la publicación *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ y en el documento M29-A4 del CLSI.¹⁵
- M. Los reactivos **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** y **DNA SD** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- N. Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- O. Todos los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- P. No utilice elementos desechables caducados.
- Q. No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el **cobas z** 480 analyzer. Limpie el **cobas z** 480 analyzer según las instrucciones detalladas en el Manual de usuario correspondiente del **cobas**[®] 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**[®] 4800 System.
- R. Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del **cobas z** 480 analyzer, consulte el Manual de usuario del **cobas**[®] 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**[®] 4800 System.
- S. Se recomienda el uso de pipetas desechables estériles y puntas de pipeta sin DNasa.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

- A. No congele los reactivos.
- B. Almacene los reactivos **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF OM**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** y **DNA SD** a una temperatura de 2-8 °C. Una vez abiertos, los reactivos permanecen estables para 4 usos durante 60 días o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero.
- C. Es necesario proteger de la exposición a la luz el reactivo **BRAF OM** y la Master Mix de trabajo (preparada mediante la adición de **BRAF OM** y **MGAC** a **RXNMIX**).
- D. La Master Mix de trabajo (preparada mediante la adición de **BRAF OM** y **MGAC** a **RXNMIX**) debe almacenarse a una temperatura de 2-8 °C en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la Master Mix de trabajo.
- E. Las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables hasta 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C, hasta 14 días a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C o hasta 60 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C, o después de someterse a 3 ciclos de congelación/descongelación si se almacenan a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C. El ADN extraído debe amplificarse durante los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit utilizado para extraer el ADN, lo que se produzca primero.
- F. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la Master Mix de trabajo (preparada mediante la adición de **BRAF OM** y **MGAC** a **RXNMIX**).

MATERIALES SUMINISTRADOS

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

BRAF

24 pruebas

RXNMIX

(Mezcla de reacción) (Tapón con botón semitransparente)

MGAC

(Acetato de magnesio) (Tapón con botón amarillo)

BRAF OM

(Mezcla de oligonucleótidos BRAF) (Tapón negro con botón blanco)

BRAF MUT

(Control de mutación en BRAF) (Tapón con botón rojo)

BRAF WT

(Control de BRAF no mutado) (Tapón con botón azul)

DNA SD

(Diluyente para muestras de ADN) (Tapón con botón púrpura)

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
- Placa de PCR (placa de amplificación y detección) y plástico de sellado (Roche M/N: 05232724001) para el **cobas®** 4800 System
- Pipeteadores ajustables*: (con capacidad para suministrar 10 µl, 20 µl, 200 µl y 1.000 µl) con puntas con filtro para aerosol o exentas de DNasa con desplazamiento positivo
- Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR) (cualquier proveedor)
- Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN**
- Agitador vórtex**
- Bandejas de tubos para microcentrífuga
- Guantes de laboratorio, sin polvo
- Congelador que permita el almacenamiento de -25 °C a -15 °C

* *El mantenimiento de los pipeteadores debe realizarse según las instrucciones del fabricante y la precisión de los mismos debe estar dentro del 3 % del volumen indicado. Para evitar la degradación y la contaminación cruzada de la muestra, deben usarse puntas exentas de DNasa con filtro para aerosol o desplazamiento positivo cuando así se especifique.*

** *Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.*

Instrumentos y programa

- **cobas z** 480 analyzer
- Unidad de control del **cobas®** 4800 SR2 System con una imagen del sistema operativo Windows XP
- Software del **cobas®** 4800 SR2 System versión 2.0 o posterior
- Software del paquete de análisis BRAF versión 1.0 o superior
- Lector de códigos de barras (Roche M/N: 05339910001)
- Impresora HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

NOTA: *manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.*

A. Obtención de muestras

Las muestras de FFPET se han validado para su uso con la prueba **cobas** BRAF.

B. Transporte de las muestras

Las muestras de FFPET pueden transportarse a 15-30 °C. El transporte de las muestras de FFPET debe cumplir la reglamentación nacional, federal, estatal local y nacional para el transporte de agentes etiológicos¹⁶.

C. Almacenamiento de las muestras

Se ha confirmado la estabilidad de las muestras de FFPET conservadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante un máximo de 12 meses tras la fecha de la obtención. Las secciones de FFPET de 5 µm colocadas en portaobjetos pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 15 y 30 °C hasta 60 días.

INSTRUCCIONES DE USO

NOTA: todos los reactivos, excepto RXNMIX, MGAC y BRAF OM, deben permanecer a temperatura ambiente antes de su uso. Los reactivos RXN MIX, MGAC y BRAF OM deben retirarse directamente del almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2-8 °C para preparar la Master Mix de trabajo.

NOTA: solo las secciones de FFPET de melanoma y CPT de 5 µm de grosor que contengan como mínimo un 50 % de células tumorales deben utilizarse en la prueba cobas BRAF. Las muestras que contengan menos de un 50 % de células tumorales deben someterse a macrodissección después de la desparafinación.

NOTA: consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones de funcionamiento detalladas del cobas z 480 analyzer.

Tamaño de la serie

El kit de la prueba cobas BRAF está diseñado para analizar un mínimo de 3 muestras más los controles y con un máximo de 24 muestras más los controles. Es posible analizar menos de 3 muestras más los controles de forma simultánea, pero es probable que el volumen de reactivos sea insuficiente para ejecutar un total de 24 muestras más los controles del kit. La prueba cobas BRAF contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras más los controles. Para realizar cada serie se requiere una réplica del control de mutación [BRAF MUT] de la prueba cobas BRAF y una réplica del control no mutado [BRAF WT] de la prueba cobas BRAF (consulte el apartado "Control de calidad").

Flujo de trabajo

NOTA: la prueba cobas BRAF puede utilizarse con hasta 24 muestras en una serie.

NOTA: para maximizar el uso de los reactivos, una serie de pruebas debe incluir un mínimo de tres (3) muestras de pacientes junto con los controles.

Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras de FFPET mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Macrodissección

Si la muestra contiene menos de un 50 % de células tumorales por área, será necesario proceder a su macrodissección como parte de la preparación de la muestra.

Cuantificación del ADN

NOTA: la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.

- A. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos antes de la cuantificación.
- B. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice DNA EB del cobas® DNA Sample Preparation Kit como blanco para el instrumento. Es necesario un promedio de 2 lecturas coincidentes. Si las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/µl, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN $< 20,0$ ng/µl, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los $\pm 2,0$ ng/µl.
- C. La concentración de stock de ADN debe ser ≥ 5 ng/µl para realizar la prueba cobas BRAF.

NOTA: cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 5 ng/µl para realizar la prueba cobas BRAF. Si la concentración de un stock de ADN es < 5 ng/µl, repita los procedimientos de desparafinación, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN para la muestra en cuestión utilizando dos secciones de FFPET de 5 µm. En los casos de las muestras colocadas en portaobjetos, tras la desparafinación, combine el tejido de ambas secciones en un tubo, sumerja el tejido en TLB + PK del cobas® DNA Sample Preparation Kit y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine el tejido de las dos secciones en un tubo y lleve a cabo los procesos de desparafinación, aislamiento y cuantificación de ADN. Si la concentración del stock de ADN sigue siendo < 5 ng/µl, solicite otra sección de muestra de FFPET al centro clínico correspondiente.

NOTA: las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables hasta 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C, hasta 14 días a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C o hasta 60 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C, o después de someterse a 3 ciclos de congelación/descongelación si se almacenan a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C. El ADN extraído debe amplificarse durante los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para extraer el ADN, lo que se produzca primero.

AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

NOTA: para evitar la contaminación de la Master Mix de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %. la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Configuración del equipo

Consulte el Manual de usuario del **cobas**[®] 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**[®] 4800 System para obtener instrucciones detalladas sobre la configuración del **cobas z** 480 analyzer.

Configuración de las peticiones de pruebas

Consulte el Manual de usuario del **cobas**[®] 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**[®] 4800 System para conocer los pasos del flujo de trabajo de la prueba **cobas** BRAF.

Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra

Solo se ejecuta una amplificación/detección por muestra, con 25 µl de una dilución de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng en total). En las instrucciones que aparecen a continuación se indica cómo preparar un mínimo de 35 µl de stock de ADN diluido a 5 ng/µl, según la concentración inicial del stock de ADN. De esta manera se garantiza que cada muestra contenga un mínimo de 5 µl de stock de ADN para evitar las variaciones que puedan producirse al pipetear volúmenes inferiores de muestra.

Cálculo de la dilución para el stock de ADN de muestras con concentraciones comprendidas entre 5 ng/µl y 35 ng/µl

NOTA: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

NOTA: solo se ejecuta una amplificación/detección por muestra, con 25 µl de una dilución de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng en total).

- A. Para cada muestra, determine la cantidad de stock de ADN requerido mediante la fórmula siguiente:
Volumen de stock de ADN necesario = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div \text{concentración de stock de ADN en ng/µl}$
- B. Para cada muestra, determine la cantidad de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**) requerido mediante la fórmula siguiente:
Volumen de DNA SD requerido en µl = $(35 \text{ µl} - \text{volumen de stock de ADN requerido en µl})$
- Ejemplo:
Concentración de stock de ADN = 21 ng/µl
- A. Volumen de stock de ADN requerido = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$
- B. Volumen de DNA SD requerido en µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra con concentraciones > 35 ng/µl

NOTA: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

NOTA: solo se ejecuta una amplificación/detección por muestra, con 25 µl de una dilución de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng en total).

- A. Con concentraciones de stock de ADN > 35 ng/µl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**) necesario para preparar al menos 35 µl de stock de ADN diluido. De este modo se asegura de que cada muestra utilice como mínimo 5 µl de stock de ADN,
Vol. de DNA SD requerido en µl = $[(5 \text{ µl de stock de ADN} \times \text{conc. de stock de ADN en ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl}$
- B. Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 µl de stock de ADN.
- Ejemplo:
Concentración de stock de ADN = 42 ng/µl
- A. Vol. de DNA SD requerido en µl = $[(5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$
- B. Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 µl de stock de ADN.

Dilución de las muestras

- A. Prepare el número necesario de tubos para microcentrífuga de 1,5 ml para diluciones de stock de ADN de muestras. Para ello, etiquételos con la identificación de muestra correcta en el área para inclusión de muestras.
- B. Con un pipeteador con punta resistente a aerosoles, pipetee el volumen calculado de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**) en cada tubo de muestras etiquetado.
- C. Agite cada stock de ADN de muestra durante 10 segundos.

- D. Con ayuda de un pipeteador con punta resistente a los aerosoles, pipetee con cuidado el volumen calculado de cada stock de ADN de la muestra en el tubo etiquetado debidamente que contenga **DNA SD**. Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- E. Tape y mezcle cada uno de los stocks de ADN de muestra diluida mezclándolos durante 10 segundos.
- F. Cámbiese los guantes.

Preparación de la Master Mix de trabajo (MMX)

NOTA: la mezcla de oligonucleótidos **BRAF** y la solución **MMX** de trabajo son sensibles a la luz. Todas las mezclas abiertas de **BRAF OM** y solución **MMX** de trabajo deben protegerse de la exposición a la luz.

- A. Calcule el volumen de **RXNMIX** necesario con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de RXNMIX necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 10 \mu\text{l}$$
- B. Calcule el volumen de **BRAF OM** necesario con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de BRAF OM necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 8 \mu\text{l}$$
- C. Calcule el volumen de **MGAC** necesario con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 7 \mu\text{l}$$

Puede utilizar la Tabla 1 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la solución MMX de trabajo a partir del número de muestras de cada serie.

Tabla 1

		Volúmenes de reactivos necesarios para la solución MMX de trabajo									
		N.º de muestras*									
		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
Vol. Total (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* N.º de muestras + 2 controles + 1

- D. Obtenga los viales necesarios de **RXNMIX**, **BRAF OM** y **MGAC** de la nevera a 2-8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos para que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrifuga estéril para la Master Mix de trabajo (MMX).
- E. Añada el volumen calculado de **RXNMIX** al tubo marcado para la solución MMX.
- F. Añada el volumen calculado de **BRAF OM** al tubo marcado para la solución MMX.
- G. Añada el volumen calculado de **MGAC** al tubo marcado para la solución MMX.
- H. Agite el tubo durante 5 segundos para asegurar una buena mezcla.

NOTA: utilice únicamente la placa de PCR (placa de amplificación y detección) y el plástico de sellado (Roche M/N: 05232724001) para el cobas® 4800 System.

- I. Pipetee con cuidado 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección necesario para la serie. No permita que la punta de la pipeta toque la parte exterior de la placa del pocillo en cuestión.

Adición de controles y muestras

- A. Añada 25 µl de control **BRAF MUT** al pocillo **A01** de la placa de amplificación y detección y utilice un pipeteador para mezclar bien y aspirar y dispensar la mezcla en el pocillo un mínimo de dos veces.
- B. Con una nueva punta de pipeta, añada 25 µl de control **BRAF WT** al pocillo **B01** de la placa de amplificación y detección y utilice un pipeteador para mezclar bien y luego aspirar y dispensar la mezcla en el pocillo un mínimo de dos veces.

NOTA: cada serie debe contener tanto un control **BRAF MUT** en la posición **A01** como un control **BRAF WT** en la posición **B01**; de lo contrario, el analizador cobas z 480 invalidará la serie.

NOTA: cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

- C. Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, añada 25 µl de ADN de muestra diluido en el pocillo correspondiente que contenga MMX de trabajo, empezando por la posición **C01** de la placa de amplificación y detección y siguiendo la disposición que se muestra en la Ilustración 1. Mezcle la reacción con ayuda del pipeteador para aspirar y dispensar la mezcla en el pocillo un mínimo de dos veces. Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior del pocillo.

NOTA: el ADN de la muestra y los controles deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de la Master Mix de trabajo (MMX).

Ilustración 1

Distribución de la placa de muestras												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRAF MUT	Muestra 7	Muestra 15	Muestra 23								
B	BRAF WT	Muestra 8	Muestra 16	Muestra 24								
C	Muestra 1	Muestra 9	Muestra 17									
D	Muestra 2	Muestra 10	Muestra 18									
E	Muestra 3	Muestra 11	Muestra 19									
F	Muestra 4	Muestra 12	Muestra 20									
G	Muestra 5	Muestra 13	Muestra 21									
H	Muestra 6	Muestra 14	Muestra 22									

- D. Continúe hasta que termine de añadir todas las muestras de la prueba a la placa de amplificación y detección.
- E. Tape la placa de amplificación y detección con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para asegurarse de que el plástico se adhiere bien a la placa de amplificación y detección.
- F. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la amplificación y detección.

NOTA: los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir el ADN de la muestra y los controles a la solución MMX de trabajo.

Inicio de la PCR

Consulte el Manual de usuario del **cobas**[®] 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**[®] 4800 System para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo para BRAF.

Interpretación de los resultados

NOTA: la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el cobas[®] 4800 BRAF AP software.

NOTA: una serie válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2
Interpretación de los resultados de las muestras

Resultado de la prueba cobas BRAF	Interpretación
Mutation Detected	Mutación V600 detectada en el codón 600 del exón 15 de BRAF
Mutation Not Detected o No Mutation Detected*	Mutación V600 no detectada en el codón 600 del exón 15 de BRAF
Invalid	El resultado no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos que figura más adelante.
Failed	Serie errónea debido a un problema de hardware o software.

* Un resultado "Mutation Not Detected" o "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en el codón 600 de BRAF porque los resultados dependen del número de copias de la secuencia mutada existentes en la muestra y pueden verse afectados por la integridad de la misma, por la cantidad de ADN aislado y por la presencia de sustancias interferentes.

Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos

- A. Repita la dilución del stock de ADN de la muestra no válida empezando por los procedimientos **Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra** y **Dilución de las muestras** del apartado **AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN**.

Nota: *si no queda suficiente stock de ADN para realizar una dilución nueva de stock de ADN, consiga una nueva sección de tejido de 5-µm y vuelva a aislar el ADN mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190). Una vez realizado, continúe con el Paso B que se explica a continuación.*

- B. Después de aplicar una dilución de 5 ng/µl al stock de ADN según las instrucciones del apartado **Dilución de las muestras**, realice una dilución adicional con una proporción 1:2 a partir de 20 µl de stock de ADN diluido y añada 20 µl de diluyente para muestras de ADN (**DNA SD**).
- C. Continúe con los pasos descritos en el apartado **Preparación de la Master Mix de trabajo (MMX)** y con los demás pasos del proceso de amplificación y detección.

Nota: *si la muestra sigue siendo no válida después de volver a analizarla con una dilución 1:2, repita todo el procedimiento de análisis con la misma muestra, empezando por el proceso de aislamiento de ADN con el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) con una nueva sección de FFPE de 5-µm. Debería utilizarse el estándar de 25 µl de ADN a 5 ng/µl (sin más dilución) para la amplificación y la detección.*

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie se incluye un control de mutación (**BRAF MUT**) y un control no mutado (**BRAF WT**) de la prueba **cobas BRAF**. Se considera que una serie es válida cuando es válido el estado de control del pocillo del control **BRAF MUT (A01)** y el pocillo del control **BRAF WT (B01)**. Si alguno de los controles **BRAF MUT** o **BRAF WT** no es válido, debe repetirse la serie. Prepare una dilución nueva del stock de ADN de la muestra aislada previamente para configurar una nueva placa de amplificación y detección con controles para la amplificación y detección.

Control de mutación en BRAF

El resultado del control **BRAF MUT** debe ser "Valid". Si los resultados del control **BRAF MUT** no son válidos de forma reiterada, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control de BRAF no mutado

El resultado del control **BRAF WT** debe ser "Valid". Si los resultados del control **BRAF WT** no son válidos de forma reiterada, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

PRECAUCIONES DURANTE EL PROCEDIMIENTO

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial aplicar una técnica adecuada de laboratorio para obtener un rendimiento correcto del ensayo. Debido a la elevada sensibilidad analítica de las pruebas basadas en PCR, deben extremarse las precauciones para evitar cualquier tipo de contaminación de los reactivos y las mezclas de amplificación.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Analice solo los tipos de muestras indicados. La prueba **cobas BRAF** se ha validado para su uso exclusivo con muestras de FFPE de melanoma y CPT.
2. La prueba **cobas BRAF** se ha validado utilizando únicamente el **cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)** para la extracción del ADN genómico.
3. La detección de una mutación depende del número de copias de la secuencia de mutación existentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que la fijación, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras sean adecuados. Siga los procedimientos especificados en el Boletín técnico y en el Manual de usuario del **cobas® 4800** y la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
5. La incorporación de la enzima AmpErase a la mezcla de reacción de la prueba **cobas BRAF** permite realizar una amplificación selectiva del ADN objetivo; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en esta metodología del reactivo para evitar la contaminación de los reactivos.
6. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del **cobas® 4800 System**.
7. Solamente el **cobas® 4800 System** se ha validado para su uso con este producto. No se ha validado ningún otro sistema de PCR con este producto.
8. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas antes de cambiar de una a otra.
9. Tampoco se han evaluado los efectos de otras variables potenciales como la fijación de muestras.
10. Aunque es poco probable, las mutaciones y variaciones de las regiones del gen BRAF cubiertas por los cebadores o las sondas de la prueba **cobas BRAF** pueden dar lugar a errores en la amplificación del alelo BRAF V600 o en la detección de la presencia de la mutación en el codón 600.
11. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.

12. La melanina es un inhibidor conocido de las reacciones de PCR. El kit de preparación de muestras de ADN elimina la melanina de la muestra durante la extracción; sin embargo, si la muestra todavía presenta melanina, es posible que se obtengan resultados no válidos. Si se sospecha de una posible inhibición por melanina, se recomienda repetir el análisis con una dilución 1:2, tal como se describe en el apartado “Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos”.
13. La prueba **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation muestra una reactividad cruzada limitada con muestras que presentan mutaciones distintas de la V600E (V600K, V600D y V600E2). Consulte el apartado “Melanoma - Evaluación no clínica del rendimiento” para obtener información más detallada.
14. Las muestras de FFPET que contienen ADN degradado pueden afectar la capacidad de la prueba para detectar la mutación.
15. La prueba **cobas** 4800 BRAF Mutation es una prueba cualitativa. La prueba no debe utilizarse para mediciones cuantitativas de la mutación.

I. MELANOMA

EVALUACIÓN NO CLÍNICA DEL RENDIMIENTO

Para los estudios no clínicos descritos más abajo, el porcentaje (%) de células tumorales se valoró mediante revisión patológica mientras que el contenido de melanina se valoró mediante revisión patológica y un ensayo interno para la determinación de melanina. Se utilizó la secuenciación bidireccional Sanger para seleccionar las muestras de análisis. El porcentaje de nivel de mutación se determinó mediante la secuenciación 454 (método cuantitativo de pirosecuenciación masiva en paralelo).

Sensibilidad analítica

Sensibilidad analítica - Límite de detección (LoD)

La cantidad mínima de ADN inicial que genera resultados correctos en un 95 % de las ocasiones se valoró mediante paneles de dilución preparados a partir de tres tipos de muestras:

- Mezclas de muestras preparadas mezclando stocks de ADN obtenidos de muestras de FFPET con la mutación V600E en BRAF y muestras de FFPET de BRAF no mutado para conseguir niveles de mutación específicos.
- Stocks de ADN de muestras de FFPET individuales preparadas a partir de tres muestras de FFPET con la mutación V600E en BRAF.
- Mezcla de líneas celulares preparada mezclando stocks de ADN obtenidos de una línea celular con mutación V600E en BRAF y una línea celular de BRAF no mutada.

Todas las muestras utilizadas en este estudio se sometieron a secuenciación 454 para determinar el porcentaje de mutación de cada muestra.

Sensibilidad analítica con mezclas de muestras

Se mezclaron stocks de ADN de muestras de FFPET con mutación V600E en BRAF con stocks de ADN de muestras de FFPET de BRAF no mutado para obtener una muestra con un nivel de mutación aproximado del 10 %, tres muestras con ~5 % y una muestra con ~3 %. También se analizó una muestra sin mutación BRAF. Después de la mezcla, se comprobaron los niveles de mutación mediante secuenciación 454. A continuación, se diluyó cada una de las cinco mezclas de muestras con mutación V600E (excepto la muestra no mutada) para generar los miembros del panel que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3
Preparación de los miembros del panel de dilución a partir de las mezclas de muestras

Mezcla	% medio de mutación*	Volumen de ADN en miembros del panel de dilución (ng/25 µl)**
Mezcla del 10 %	9 % (n = 6)	125; 62,5; 31,3
Mezcla 1 del 5 %	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mezcla 2 del 5 %	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mezcla 3 del 5 %	6 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mezcla del 2,5 %	3 % (n = 5)	125; 62,5; 31,3
0 % (solamente no mutado)	- - -	125

* Porcentaje medio de mutación de la mezcla, analizado mediante secuenciación 454.

** Volumen de ADN genómico contenido en cada miembro del panel. 25 µl es el volumen de introducción de la muestra para la prueba.

Se analizaron 8 réplicas de cada miembro del panel con cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba **cobas** BRAF (n = 24/miembro del panel). En la Tabla 4 se muestra la sensibilidad de cada mezcla de FFPET determinada por el volumen más bajo de ADN que ha generado una tasa de resultados “Mutation Detected” para BRAF V600E de como mínimo un 95 % (filas sombreadas).

Tabla 4
Sensibilidad de la prueba cobas BRAF con mezclas de muestras de FFPET

Mezcla de FFPET	Porcentaje de mutación mediante secuenciación 454	Volumen de ADN en el miembro del panel	Tasa de resultados “Mutation Detected” (n = 24)
Mezcla de FFPET del 10 %	9 %	125 ng/25 µl	100 %
		62,5 ng/25 µl	100 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
Mezcla de FFPET 1 del 5 %	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 %
Mezcla de FFPET 2 del 5 %	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 %
Mezcla de FFPET 3 del 5 %	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 %
Mezcla de FFPET del 2,5 %	3 %	125 ng/25 µl	0 %
		62,5 ng/25 µl	4 %
		31,3 ng/25 µl	4 %
0 % (no mutado)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Este estudio demuestra que la prueba **cobas** BRAF es capaz de detectar la mutación V600E en BRAF cuando el nivel de mutación es ≥ 5 % con un volumen inicial estándar de 125 ng/25 µl. La capacidad de la prueba para detectar la mutación en volúmenes iniciales de ADN inferiores pone de manifiesto que las muestras pueden contener ADN degradado derivado del proceso de fijación sin que ello afecte el proceso de detección de la mutación. Todos los resultados de la prueba obtenidos con la muestra de BRAF no mutada fueron “Mutation Not Detected”.

Sensibilidad analítica con muestras de FFPET

Para confirmar el nivel de detección del 5 % de la mutación en muestras de pacientes, se procesaron individualmente cuarenta y ocho secciones individuales de 5 µm de cada una de las 3 muestras de FFPET con mutación V600E en BRAF con niveles de mutación del 6 %, 12 % y 4 % mediante los 3 lotes del **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a fin de aislar el ADN. Para valorar el impacto de la melanina en el ensayo, una de las muestras (con un nivel de mutación del 6 %) contenía una concentración elevada de melanina. Se prepararon diluciones en serie del ADN de cada sección para crear el conjunto de 6 miembros de panel que se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5
Preparación de los miembros del panel de dilución a partir de muestras de FFPET

Muestra de FFPET	Información de la muestra		Volumen de ADN en miembros del panel de dilución (ng/25 µl)
	% medio de mutación V600E*	Pigmentación	
Muestra 1	6 %	Alta pigmentación**	125; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0
Muestra 2	12 %	NHP***	125; 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5
Muestra 3	4 %	NHP	125; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0

* Porcentaje medio de mutación de la muestra determinado mediante secuenciación 454

** Alta pigmentación según exploración visual, concentración de melanina = 0,17 µg /25 µl

*** NHP = sin pigmentación elevada según exploración visual

Se analizaron 16 réplicas de cada miembro del panel con cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba **cobas** BRAF (n = 48/miembro del panel). La sensibilidad de cada muestra de FFPET se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó una tasa de resultados "Mutation Detected" para BRAF V600E de como mínimo un 95 % (filas sombreadas). Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6
Sensibilidad de la prueba cobas BRAF con muestras de FFPET

Muestra de FFPET	Porcentaje de mutación mediante secuenciación 454	Volumen de ADN en el miembro del panel	Tasa de resultados "Mutation Detected" (n = 48)
Muestra 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 %
Muestra 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 %
Muestra 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 %

Este estudio ha demostrado que la prueba **cobas** BRAF es capaz de detectar la mutación V600E en BRAF en las muestras de FFPET clínicas actuales cuando el nivel de mutación es ≥ 5 % con un volumen inicial estándar de 125 ng/25 µl. La capacidad de la prueba para detectar la mutación en volúmenes iniciales de ADN inferiores pone de manifiesto que las muestras pueden contener ADN degradado derivado del proceso de fijación sin que ello afecte el proceso de detección de la mutación. Todo parece indicar que una muestra con alta pigmentación incluida en el estudio no incidió en la sensibilidad de la prueba.

Sensibilidad analítica con mezclas de líneas celulares

Se mezclaron dos stocks de ADN de líneas celulares de melanoma [SK-MEL 28 (mutación V600E en BRAF) y SK-MEL 2 (BRAF no mutado)] para obtener una muestra con una mutación del 5 %, comprobada mediante secuenciación 454. Se prepararon tres paneles de dilución distintos con volúmenes de ADN comprendidos entre 125 ng/25 µl y 0 ng/25 µl. Se analizaron 20 réplicas de cada miembro del panel con cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba **cobas** BRAF (60 réplicas en total). La sensibilidad se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó una tasa de resultados "Mutation Detected" para BRAF V600E de un 95 % como mínimo (fila sombreada). Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7
Sensibilidad de la prueba cobas BRAF con mezclas de líneas celulares

Mezcla de líneas celulares	Porcentaje medio de mutación mediante secuenciación 454	Volumen de ADN en el miembro del panel	Tasa de resultados "Mutation Detected" (n = 60)
Mezcla de líneas celulares	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 %

En el análisis con la prueba **cobas** BRAF se obtuvo una tasa de resultados "Mutation Detected" del 95 % con un volumen de 3,9 ng/25 µl (que representa una dilución 1:32) del volumen inicial de ADN recomendado de 125 ng/25 µl. Estos datos sugieren que la prueba es capaz de detectar la mutación V600E en BRAF incluso cuando ~97 % del ADN se degrada como consecuencia del proceso de fijación, partiendo de la base de que el ADN de línea celular contenía un 100 % de ADN intacto y amplificable.

Intervalo genómico inicial

El volumen inicial de ADN recomendado para la prueba **cobas** BRAF es de 125 ng. Los errores de cuantificación del ADN pueden generar diferentes volúmenes iniciales de ADN genómico, así como variaciones en el volumen de ADN degradado. Para evaluar los efectos de los diferentes volúmenes iniciales de ADN genómico, se extrajo ADN genómico de 11 muestras de FFPET de melanoma, seleccionadas por su estado de mutación y nivel de pigmentación, y se diluyeron en serie con volúmenes de muestra de 250 ng, 125 ng, 62,5 ng y 31,3 ng/25 µl. Los 4 niveles de ADN se evaluaron con ayuda de 2 lotes. Se obtuvieron los resultados previstos para todos los niveles de volumen inicial de ADN genómico.

Contenido tumoral mínimo

Se analizaron 33 muestras con mutación V600E en BRAF para determinar la proporción tumoral mínima necesaria para detectar la mutación V600E en BRAF en muestras con un contenido tumoral comprendido entre un 5 % y un 50 %, sin macrodissección. Se analizó 1 sección de cada muestra con la prueba **cobas** BRAF.

La prueba **cobas** BRAF detectó correctamente todas las muestras con mutación V600E en BRAF cuyo porcentaje de ADN mutado mínimo era superior al 5 % y con un contenido tumoral mínimo del 15 %, tal como se muestra en la Tabla 8. Las muestras con menos de un 15 % de contenido tumoral y niveles de mutación inferiores al 5 % generaron resultados de mutación no detectada. Se evaluaron 24 muestras no mutadas adicionales con un contenido tumoral comprendido entre el 5 % y el 45 % con una concentración recomendada de volumen inicial de ADN de 125 ng/25 µl. La prueba logró genotipar correctamente todas las muestras no mutadas. Es necesario proceder a una macrodissección de las muestras con un contenido tumoral < 50 % por zona.

Tabla 8
Resultados del análisis de 33 muestras BRAF V600E con porcentajes diferentes de contenido tumoral y mutación

Número de muestra	Contenido tumoral*	% de mutación	Resultado de la prueba
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

Número de muestra	Contenido tumoral*	% de mutación	Resultado de la prueba
9	15 % / 15 %	29 %	Mutation Detected
10	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
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

** Se ha valorado el contenido tumoral de la muestra mediante el examen por parte de un patólogo de la primera y la última de las doce secciones de 5 µm adyacentes de cada muestra. Se muestra el contenido tumoral de la primera y de la última sección (por ejemplo, 95 % / 95 %).*

Reactividad cruzada

La reactividad cruzada de la prueba **cobas** BRAF se evaluó mediante análisis con los siguientes tipos de muestras:

- Muestras de FFPET de melanoma con mutaciones en BRAF distintas de V600E y distintos niveles de mutación
- Plásmidos de mutaciones en BRAF distintas de V600E
- Plásmidos de homólogos BRAF
- Microorganismos relacionados con la piel

Para la evaluación de la reactividad también se tuvo en cuenta el hecho de que la presencia de plásmidos de homólogos de BRAF o microorganismos de la piel pudieran interferir en la detección de la mutación V600E en BRAF.

Muestras de FFPET de melanoma con mutaciones en BRAF distintas de V600E

Se analizaron por triplicado 14 muestras de FFPET de melanoma con mutaciones en BRAF distintas de V600E (V600D, V600E2, V600R o V600K) con la prueba **cobas** BRAF. Las tres réplicas de ocho de las muestras con mutaciones en BRAF distintas de V600E mostraron reactividad cruzada con la prueba **cobas** BRAF. Estas ocho muestras procedían de muestras con mutaciones V600D en BRAF (18 % de las mutaciones), mutaciones V600E2 en BRAF (68 % de las mutaciones) o mutaciones V600K en BRAF (más de un 30 % de las mutaciones). No se observó reactividad cruzada con la muestra con mutación V600R en BRAF (23 % de las mutaciones), como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9
Tasas de resultados “Mutation Detected” de la prueba cobas BRAF para mutaciones en BRAF distintas de V600E en muestras de FFPET

Número de muestra	Estado de la mutación en BRAF	Porcentaje de la mutación	Contenido tumoral*	Estadio tumoral	Tasa de resultados “Mutation Detected” (n = 3)
1	V600D	18 %	30 % / 30 %	IV	100 %
2	V600E2	16 %	75 % / 75 %	IV	0 %
3		36 %	75 % / 80 %	III	0 %
4		68 %	75 % / 75 %	IV	100 %
5	V600R	23 %	15 % / 15 %	IV	0 %
6	V600K	17 %	25 % / 25 %	III	0 %
7		22 %	35 % / 40 %	IV	0 %
8		23 %	40 % / 40 %	IV	0 %
9		31 %	60 % / 60 %	IV	100 %
10		35 %	75 % / 75 %	IV	100 %
11		39 %	80 % / 80 %	IV	100 %
12		36 %	95 % / 95 %	IIC	100 %
13		62 %	75 % / 75 %	IV	100 %
14		69 %	80 % / 80 %	IV	100 %

* Se ha valorado el contenido tumoral de la muestra mediante el examen por parte de un patólogo de la primera y la última de las doce secciones de 5 µm adyacentes de cada muestra. Se muestra el contenido tumoral de la primera y de la última sección (por ejemplo, 95 % / 95 %).

Se preparó un panel de dilución de once miembros con concentraciones de ADN comprendidas entre 5,0 ng/µl y 0,0049 ng/µl (lo que equivale al intervalo de 125 a 0,1 ng de ADN del volumen inicial de 25 µl de ADN para la prueba) y cada miembro del panel se analizó por triplicado para determinar el volumen más bajo de ADN que permite obtener una tasa de resultados “Mutation Detected” del 100 % para las ocho muestras que presentaban reactividad cruzada con la prueba **cobas** BRAF. El nivel más bajo de ADN inicial antes de detectarse una pérdida de la reactividad cruzada de la muestra osciló entre 0,5 ng/25 µl para una muestra con mutación V600K en BRAF con un 69 % de mutación y 15,6 ng/25 µl para una muestra con mutación V600D en BRAF con un 18 % de mutación (Tabla 10).

Tabla 10
Nivel más bajo de ADN inicial para detectar la reactividad cruzada de la prueba cobas BRAF

Número de muestra	Estado de la mutación en BRAF	Porcentaje de la mutación	Nivel más bajo de volumen de ADN inicial previo a la pérdida de reactividad cruzada (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

Plásmidos de BRAF distintos de V600E

Se prepararon paneles de dilución de plásmidos con niveles de mutación comprendidos entre un 5 % y un 75 % sobre un fondo de plásmidos no mutados para las siguientes nueve mutaciones en BRAF distintas de V600E: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K y V600R. Se analizaron tres réplicas de cada miembro de los paneles de dilución preparados para cada plásmido con la prueba **cobas** BRAF. Se detectó reactividad cruzada en las 3 réplicas del plásmido BRAF V600D con ≥ 10 % de mutación, del plásmido BRAF V600K con ≥ 35 % de mutación y del plásmido BRAF V600E2 con ≥ 65 % de mutación. No se detectó reactividad cruzada con plásmidos con el resto de las otras seis mutaciones en BRAF analizadas.

Plásmidos de homólogos BRAF

Se prepararon muestras para tres plásmidos de homólogos de BRAF (pseudogén BRAF, ARAF y RAF1), un plásmido de la mutación V600E en BRAF y un plásmido BRAF no mutado como se indica en la Tabla 11. Se analizaron entre tres y seis réplicas de cada miembro del panel mediante la prueba **cobas** BRAF.

Tabla 11
Muestras de plásmidos de homólogos BRAF

Panel		Composición por volumen	
Nombre	Miembro	Componente 1	Componente 2
Pseudogén BRAF	1	95 % de pseudogén BRAF	5 % de mutación V600E en BRAF
	2	100 % de pseudogén BRAF	- - -
ARAF	1	95 % de ARAF	5 % de mutación V600E en BRAF
	2	100 % de ARAF	- - -
RAF1	1	95 % de RAF1	5 % de mutación V600E en BRAF
	2	100 % de RAF1	- - -
Control	1	95 % de BRAF no mutado	5 % de mutación V600E en BRAF
	2	100 % de BRAF no mutado	- - -
	3	95 % de buffer de elución de ADN	5 % de mutación V600E en BRAF

Ninguno de los tres plásmidos de homólogos de BRAF analizados se pudieron detectar con la prueba **cobas** BRAF cuando se analizaron solos, lo que indica que los plásmidos de homólogos de BRAF no presentan reactividad cruzada con la prueba.

El plásmido de la mutación V600E en BRAF con una presencia del 5 % en el 95 % de los plásmidos de homólogos de BRAF generó el resultado "Mutation Detected" en todos los casos, lo que indica que los plásmidos de homólogos no interfieren en la detección de la mutación V600E en BRAF.

Microorganismos relacionados con la piel

Se ha detectado que los siguientes microorganismos relacionados con la piel no presentan reactividad cruzada con la prueba **cobas** BRAF cuando se añaden a una muestra de FFPET de melanoma no mutada con una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) durante el proceso de lisis del tejido:

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

Los microorganismos analizados tampoco interfirieron en la detección de una muestra de FFPET con un 8 % de mutación V600E en BRAF al añadir 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) durante el proceso de lisis del tejido.

Interferencia

Se ha demostrado que los triglicéridos (≤ 74 mM, el doble de la recomendación del CLSI para concentraciones elevadas¹⁷), la hemoglobina (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ de la recomendación del CLSI para concentraciones elevadas¹⁷) y el ≤ 95 % de tejido necrótico no interfieren con la prueba **cobas** BRAF cuando se añade la posible sustancia interferente al paso de lisis durante el proceso de preparación de la muestra.

Melanina

Se ha evaluado el impacto de concentraciones elevadas de melanina endógena mediante muestras de FFPET de melanoma con alta pigmentación. Se seleccionaron un total de 41 muestras de FFPET de tejido tumoral de melanoma para compararlas a partir de su nivel de pigmentación: 33 con pigmentación muy alta, 3 de sujetos afroamericanos y 5 con pigmentación moderada. Se extrajo ADN del tejido y se determinó la concentración de melanina para cada muestra. Se analizó una sola réplica del stock de ADN de cada una de las dos secciones obtenidas de cada una de las 41 muestras. Tres muestras generaron resultados no válidos. Una muestra generó un resultado "Mutation Not Detected", pero se determinó que la muestra estaba por debajo del límite de detección. Se utilizaron las 3 muestras que generaron resultados "Invalid" para preparar la concentración de ADN recomendada para la prueba, así como

diluciones dos, cuatro y ocho veces mayores que el volumen de ADN inicial recomendado de 125 ng/PCR. Se volvieron a analizar las muestras de ADN diluido resultantes (con un total de 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng o 15,6 ng de ADN por 25 µl) para determinar si la reducción de melanina correspondiente conseguida mediante dilución permitía obtener resultados válidos. Las tres muestras diluidas con un factor 2 veces mayor generaron resultados válidos.

Tabla 12
Resumen del rendimiento de la prueba cobas BRAF con muestras de FFPET de melanoma pigmentado

ID de muestra	Dilución	Cantidad de melanina por muestra/PCR	Resultado
1	Ninguna (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Doble (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Cuádruple (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Óctuple (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Ninguna (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Doble (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Cuádruple (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Óctuple (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Ninguna (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Doble (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Cuádruple (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Óctuple (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Los resultados del análisis de 17 muestras no mutadas muestran que se asignó correctamente un resultado “Mutation Not Detected” a todos los tipos de muestras, a excepción de 2 muestras de muy alta pigmentación que generaron resultados falsos positivos.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Reproducibilidad

Se realizó un estudio para valorar la reproducibilidad de la prueba **cobas BRAF** en 3 laboratorios de análisis externos (2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivos y durante 5 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 8 miembros de muestras de ADN obtenidas de secciones de FFPET de melanoma maligno. El panel incluía muestras tanto pigmentadas como sin pigmentar y diferentes porcentajes de contenido tumoral y alelos mutados, incluida una muestra con un límite de detección (LoD) del 5 %. De las 94 series, 92 (97,9 %) resultaron válidas. De las 1.442 muestras analizadas, 2 generaron resultados no válidos (0,14 %). Todos los miembros del panel, excepto las muestras en el LoD, alcanzaron una tasa de identificación correcta del 100 % en el caso de las pruebas válidas, incluidos los miembros del panel de muestras con un 20 % de mutación, y dos miembros del panel identificados con una muy alta pigmentación. Para el miembro del panel en el LoD, la mutación V600E se detectó en un 90 % (162/180) de las muestras. No se obtuvieron falsos positivos para ninguna de las muestras no mutadas (WT). En resumen, la prueba **cobas BRAF** presentó una reproducibilidad elevada tanto con muestras pigmentadas como no pigmentadas, con muestras con un contenido tumoral bajo y un porcentaje bajo de alelos mutados, entre laboratorios de análisis, usuarios, lotes de reactivos y días de análisis. La especificidad analítica fue del 100 %.

Correlación con el método de referencia para las muestras de ensayos clínicos de fase III

La prevalencia de la mutación V600E en el estudio clínico de fase III fue del 46,5 % según los resultados obtenidos con la prueba **cobas** BRAF. Estos datos parecen corroborar la prevalencia de V600E en pacientes con melanoma, tal como sugiere la bibliografía existente.

Para evaluar el rendimiento de la prueba **cobas** BRAF en comparación con la secuenciación bidireccional doble Sanger, se identificaron 596 pacientes consecutivos seleccionados para el ensayo de fase III de vemurafenib, de quienes se recopilaron todos los datos clínicos, demográficos y de la secuenciación Sanger. De todos ellos, 94 no pudieron participar en el estudio por no cumplir los criterios de participación, 4 carecían de revisión patológica y 2 presentaban resultados inválidos con la prueba **cobas** BRAF. De los 496 sujetos aptos para participar, 47 muestras presentaron resultados no válidos para la secuenciación Sanger, por lo que el resultado quedó en 449 muestras para analizar. En la Tabla 13 se muestra el análisis de concordancia entre los resultados de la prueba **cobas** BRAF y los resultados de la secuenciación Sanger para la detección de la mutación V600E.

Tabla 13
Resumen de los resultados de la prueba cobas BRAF y de la secuenciación Sanger

Prueba cobas BRAF (método de prueba)	Secuenciación Sanger (método de referencia)		
	Mutación V600E en BRAF detectada^a	Mutación V600E en BRAF no detectada^b	Total
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Total	222	227	449
Porcentaje de concordancia de positivos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 216 / 222 = 97,3 % (94,2 %, 98,8 %)		
Porcentaje de concordancia de negativos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 192 / 227 = 84,6 % (79,3 %, 88,7 %)		
Porcentaje de concordancia general (IC al 95 %)	100 % $\times$ 408 / 449 = 90,9 % (87,8 %, 93,2 %)		

^a Un resultado "Mutation Detected" indica la presencia del tipo de mutación en BRAF predominante, V600E, (1799 T>A), según el método Sanger.

^b Un resultado "Mutation Not Detected" indica la ausencia del tipo de mutación en BRAF predominante, V600E, según el método Sanger (p. ej., sin mutación o normal, V600D, V600E2, V600K, V600R y otras mutaciones).

Nota: muestras de melanoma con resultados válidos asignados tanto de la prueba **cobas** BRAF como de la secuenciación Sanger.

Nota: IC = (porcentaje) intervalo de confianza

Las 41 muestras con resultados discordantes para la prueba **cobas** BRAF y la secuenciación Sanger se sometieron a secuenciación 454 (método cuantitativo de pirosecuenciación masiva en paralelo) como segundo método de referencia. Además, se analizaron 33 muestras concordantes para la prueba **cobas** BRAF y la secuenciación Sanger mediante secuenciación 454. En la Tabla 14 se presenta el análisis de concordancia secundario tras la resolución de los casos discordantes.

En el caso de las 6 muestras discordantes con un resultado "Mutation Not Detected" con la prueba **cobas** BRAF y un resultado V600E mediante secuenciación Sanger, el análisis mediante secuenciación 454 generó un resultado sin mutación en 5/6 de las muestras (una de ellas generó un resultado no válido).

De las 8 muestras, del total de 35, que obtuvieron resultados discordantes (un resultado "Mutation Detected" con la prueba **cobas** BRAF y un resultado "WT" [ausencia de mutación] mediante secuenciación Sanger), el método de secuenciación 454 detectó la mutación V600E en 7 de las 8 muestras (una muestra generó un resultado no válido con el método 454).

De las 27 muestras, del total de 35, que obtuvieron resultados discordantes (un resultado "Mutation Detected" con la prueba **cobas** BRAF y un resultado de mutación distinta de V600E con la secuenciación Sanger), la secuenciación 454 detectó la mutación V600K en 24 muestras, la mutación V600E2 en una muestra y la mutación V600E en una muestra. En 1 muestra, el método Sanger detectó la mutación V600D y el método de secuenciación 454 generó un resultado de ausencia de mutación.

La reactividad cruzada de la prueba **cobas** BRAF para V600K fue del 66 % (25/38).

La concordancia con el método de secuenciación 454 fue del 100 % para las 33 muestras con resultados concordantes tanto para la mutación V600E como para la ausencia de mutación (WT) con la prueba **cobas** BRAF y la secuenciación Sanger.

Tabla 14

Resultados de la prueba cobas BRAF y de la secuenciación Sanger después de la resolución de resultados discordantes mediante secuenciación 454

Prueba cobas BRAF (método de prueba)	Después de la resolución de resultados discordantes mediante secuenciación 454		
	Mutación V600E en BRAF detectada	Mutación V600E en BRAF no detectada	Total
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Total	225	224	449
Porcentaje de concordancia de positivos (IC al 95 %)	$100 \% \times 224 / 225 = 99,6 \% (97,5 \%, 99,9 \%)$		
Porcentaje de concordancia de negativos (IC al 95 %)	$100 \% \times 197 / 224 = 87,9 \% (83,0 \%, 91,6 \%)$		
Porcentaje de concordancia general (IC al 95 %)	$100 \% \times 421 / 449 = 93,8 \% (91,1 \%, 95,7 \%)$		

Distribución de las mutaciones en BRAF en el codón 600

Se determinó la distribución de las mutaciones en el codón 600 para los 496 casos elegibles a partir de una combinación de resultados obtenidos con el método Sanger y la secuenciación 454. De los 496 casos, no se detectó la mutación en 182 casos y sí se detectó en 314. En la Tabla 15 se describe la distribución de las mutaciones en el codón 600 en los 314 casos positivos para mutación. Se identificaron mutaciones V600K en un 13,4 % de todos los casos con mutaciones en el codón 600.

Tabla 15

Distribución de las mutaciones en BRAF en el codón 600 de la población positiva para mutaciones según secuenciación Sanger y/o secuenciación 454

Secuencia de aminoácidos (codón 600)	Secuencia de nucleótidos (1798-1800)	N	% de distribución
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
Total de mutaciones en el codón 600		314	100
Total de codones 600 no mutados		182	---

Eficacia clínica de ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

La prueba **cobas** BRAF se utilizó como prueba complementaria para la selección de pacientes aptos para recibir el tratamiento con ZELBORAF®. La seguridad clínica y la efectividad de ZELBORAF® se demostraron en el estudio NO25026 (BRIM3) de fase III, un estudio internacional, aleatorizado, abierto, controlado y multicéntrico que se llevó a cabo con pacientes que no habían recibido tratamiento previo y presentaban melanoma no resecable en fase IIIC o IV con una mutación V600E en BRAF a fin de evaluar la eficacia clínica de ZELBORAF® respecto a la dacarbacina (estándar del tratamiento sanitario). Se analizaron las muestras de FFPET de todos los pacientes con melanoma considerados aptos para el tratamiento mediante la prueba **cobas** BRAF. Los pacientes con resultado "Mutation Detected" en la prueba se consideraron aptos para la inscripción en el ensayo clínico cuando cumplían otros criterios de elegibilidad. Los pacientes con un resultado "Mutation Not Detected" en la prueba se consideraron no aptos para el ensayo clínico. El estudio se efectuó en aproximadamente 104 centros en todo el mundo (22 de ellos en EE.UU.).

En el ensayo participaron 675 pacientes, de los que 337 fueron tratados con vemurafenib y 338 con dacarbacina. Las principales medidas de resultado de eficacia del ensayo fueron la tasa de supervivencia global (TSG) y la tasa de supervivencia libre de progresión (SLP) valorada por el investigador. Se incluyeron otras medidas de resultado como la tasa de respuesta global confirmada y valorada por el investigador.

Las características de referencia estaban equilibradas entre los grupos de tratamiento. La mayoría de los pacientes eran hombres (56 %) de raza caucásica (99 %), con una media de edad de 54 años (el 24 % eran ≥ 65 años) y todos presentaban un estado 0 o 1 en la escala ECOG. Casi todos ellos presentaban enfermedad metastásica (95 %).

Los resultados de eficacia del ensayo se muestran a continuación, en la Tabla 16 y la Ilustración 2:

Tabla 16

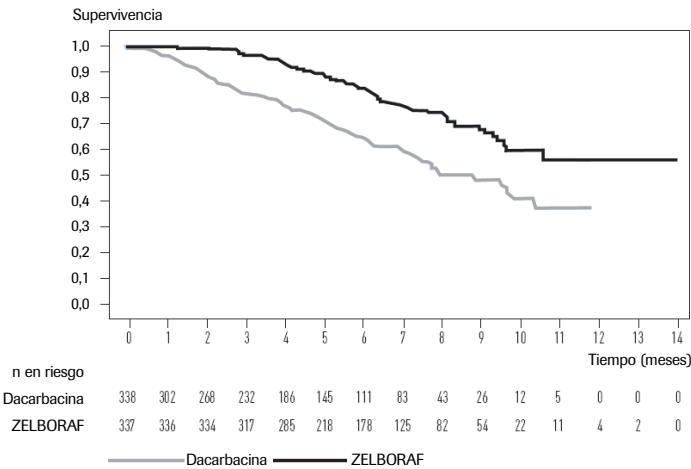
Eficacia de vemurafenib en pacientes sin tratamiento previo con melanoma positivo para la mutación V600E en BRAF^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dacarbacina (N = 338)	Valor p ^d
Supervivencia global			
Número de muertes	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Cociente de riesgos (IC del 95 %) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Mediana de supervivencia (meses) (IC del 95 %) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Mediana de seguimiento (meses) (rango)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Cociente de riesgos de supervivencia libre de progresión (IC del 95 %) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Mediana de SLP (meses) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

- ^a Según detección mediante la prueba **cobas** BRAF
^b Cociente de riesgos estimado según el modelo de Cox (cociente de riesgos < 1 en favor de vemurafenib)
^c Estimación de Kaplan-Meier
^d Prueba de rango logarítmico no estratificada
^e No se ha alcanzado

Ilustración 2

Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (pacientes sin tratamiento previo)



La mejor tasa de respuesta global confirmada y valorada por el investigador fue del 48,4 % (IC del 95 %: 41,6 %, 55,2 %) en el grupo de ZELBORAF®, en comparación con el 5,5 % (IC del 95 %: 2,8 %, 9,3 %) en el grupo de dacarbacina.

Eficacia clínica de COTELLIC® (cobimetinib)^{10, 11}

Se llevó a cabo un ensayo clínico (coBRIM) de COTELLIC®, un inhibidor de MEK, en combinación con ZELBORAF®, y se compararon los resultados con el análisis de ZELBORAF® más un placebo. Se utilizó la prueba **cobas** BRAF para determinar la elegibilidad de los pacientes para participar en este ensayo clínico. La seguridad y la eficacia de la combinación de COTELLIC® y ZELBORAF® se establecieron mediante un ensayo multicéntrico, aleatorizado (1:1), a doble ciego y controlado mediante placebo realizado con 495 pacientes con melanoma positivo para la mutación V600 en BRAF, no reseca y metastásico, y que no habían sido tratados previamente. El principal resultado de eficacia fue la tasa de supervivencia de libre progresión (SLP) valorada por el investigador según los criterios RECIST v1.1. Otros resultados de eficacia fueron la tasa de respuesta objetiva (TRO) valorada y confirmada por el investigador, la tasa de supervivencia global (TSG), la SLP valorada por un comité de revisión independiente ciego y la duración de la respuesta (DDR).

Las características de referencia estaban equilibradas entre los grupos de tratamiento. Los pacientes eran mayoritariamente hombres (58 %) de raza caucásica (93 %), con una media de edad de 55 años. El 72 % presentaba un estado 0 en la escala ECOG y el 60 % se encontraba en la fase M1c de la enfermedad.

Se analizaron las muestras de FFPET de todos los pacientes considerados aptos para el tratamiento mediante la prueba **cobas** BRAF. Los pacientes con resultado “Mutation Detected” se consideraron aptos para la participación en el ensayo cuando cumplían otros criterios de elegibilidad. Los pacientes con resultado “No Mutation Detected” no se consideraron aptos para la participación en el ensayo. El ensayo incluía pacientes con mutaciones V600K en BRAF detectadas con la prueba **cobas** BRAF, lo que demuestra la

seguridad y eficacia del producto terapéutico en el fragmento identificado de población de pacientes que sufren tumores con mutación V600K.

Los resultados de eficacia del ensayo se muestran a continuación, en la Tabla 17 y la Ilustración 3:

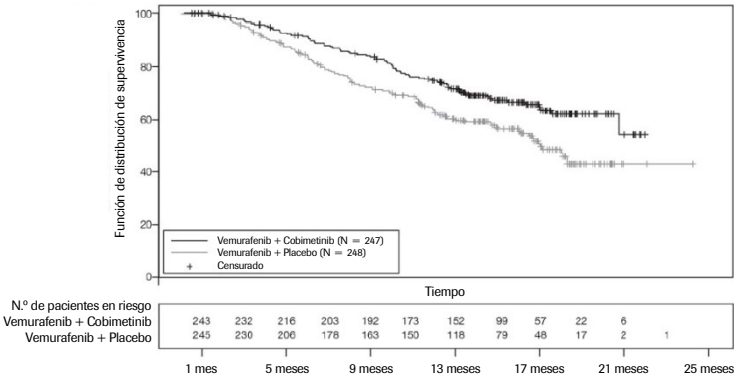
Tabla 17

Eficacia de cobimetinib en combinación con vemurafenib en pacientes con melanoma positivo para mutación en BRAF^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Placebo + Vemurafenib (N = 248)	Valor p
Supervivencia libre de progresión (valorada por el investigador)			
Número de eventos (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progresión	131	169	
Muerte	12	11	
Mediana de SLP (meses) (IC del 95 %)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Cociente de riesgos (IC del 95 %) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Supervivencia global			
Número de muertes (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Mediana de supervivencia (meses) (IC del 95 %) ^c	No estimable (20,7, no estimable)	17,0 (15,0, no estimable)	-
Cociente de riesgos (IC del 95 %) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Tasa de respuesta objetiva			
Tasa de respuesta objetiva (IC del 95 %) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Respuesta completa	16 %	10 %	
Respuesta parcial	54 %	40 %	
Mediana de duración de la respuesta, meses (IC del 95 %) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

- ^a Según detección mediante la prueba **cobas** BRAF
- ^b Cociente de riesgos estimado con el modelo de Cox (cociente de riesgos < 1 en favor de cobimetinib + vemurafenib)
- ^c Estimación de Kaplan-Meier
- ^d Prueba de rango logarítmico estratificada
- ^e Importancia estadística en función de la comparación con el valor alfa asignado de 0,019 para este análisis interno

Ilustración 3
Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global



Se analizaron retrospectivamente muestras tumorales disponibles provenientes de pacientes aleatorios utilizando la secuenciación de próxima generación (NGS) con el objetivo de clasificar también las mutaciones en BRAF como V600E o V600K. Se obtuvieron resultados de la prueba en el 81 % de los pacientes aleatorios (400/495). De entre los pacientes para los que se obtuvieron resultados con la NGS, 56 de 400 (14 %) presentaban tumores con mutaciones V600K en BRAF y el resto presentaba tumores con mutaciones V600E en BRAF. Los 56 tumores detectados retrospectivamente con la mutación V600K en BRAF se caracterizan por unas frecuencias de mutación comprendidas entre el 5,1 y el 36,6 % en el análisis. Se observó una tendencia en favor del grupo de cobimetinib con

vemurafenib en los análisis exploratorios de subgrupos de SLP, TSG y TRO para los subtipos de mutación V600 en BRAF en el 81 % de los pacientes del estudio identificados con el tipo de mutación V600 en BRAF.

II. CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES (CPT)

EVALUACIÓN NO CLÍNICA DEL RENDIMIENTO

Para los estudios no clínicos descritos más abajo, las características tumorales tales como el porcentaje (%) de células tumorales se valoraron mediante revisión patológica. Se utilizó la secuenciación bidireccional Sanger para seleccionar las muestras de análisis. El porcentaje de nivel de mutación se determinó mediante la secuenciación 454 (método cuantitativo de pirosecuenciación masiva en paralelo).

Sensibilidad analítica

Sensibilidad analítica - Límite de detección (LoD)

La cantidad mínima de ADN inicial que genera resultados correctos en un 95 % de las ocasiones se valoró mediante paneles de dilución preparados a partir de dos tipos de muestras:

- Mezclas de muestras preparadas mezclando stocks de ADN obtenidos de muestras de FFPET con la mutación V600E en BRAF y muestras de FFPET de BRAF no mutado para conseguir niveles de mutación específicos.
- Stocks de ADN de muestras de FFPET individuales preparadas a partir de dos muestras de FFPET con la mutación V600E en BRAF.

Todas las muestras utilizadas en este estudio se sometieron a secuenciación 454 para determinar el porcentaje de mutación de cada muestra.

Sensibilidad analítica con mezclas de muestras

Se mezclaron stocks de ADN de muestras de FFPET con mutación V600E en BRAF con stocks de ADN de muestras de FFPET de BRAF no mutado para obtener una muestra con un nivel de mutación de ~10 %, una muestra con ~5 % y una muestra con ~2 %. Después de la mezcla, se comprobaron los niveles de mutación mediante secuenciación 454. A continuación, se diluyó cada una de las tres mezclas de muestras con mutación V600E para generar los miembros del panel que se detallan en la Tabla 18.

Tabla 18
Preparación de los miembros del panel de dilución a partir de las mezclas de muestras

Mezcla	% medio de mutación*	Volumen de ADN en miembros del panel de dilución (ng/25 µl)**
Mezcla del 10 %	10 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Mezcla del 5 %	5 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Mezcla del 2,5 %	2 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
0 % (solamente no mutado)	- - -	125

* Porcentaje medio de mutación de la mezcla, analizado mediante secuenciación 454.

** Volumen de ADN genómico contenido en cada miembro del panel. 25 µl es el volumen de introducción de la muestra para la prueba.

Se analizaron 8 réplicas de cada miembro del panel con cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba cobas BRAF (n = 24/miembro del panel). En la Tabla 19 se muestra la sensibilidad de cada mezcla de FFPET determinada por el volumen más

bajo de ADN que ha generado una tasa de resultados “Mutation Detected” para BRAF V600E de como mínimo un 95 % (filas sombreadas).

Tabla 19
Sensibilidad de la prueba cobas BRAF con mezclas de muestras de FFPET

Mezcla de FFPET	Porcentaje de mutación mediante secuenciación 454	Volumen de ADN en el miembro del panel	Tasa de resultados “Mutation Detected” (n = 24)
Mezcla de FFPET del 10 %	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 %
Mezcla de FFPET del 5 %	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 %
Mezcla de FFPET del 2,5 %	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 % (no mutado)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Este estudio demuestra que la prueba **cobas** BRAF es capaz de detectar la mutación V600E en BRAF cuando el nivel de mutación es ≥ 5 % con un volumen inicial estándar de 125 ng/25 µl. La capacidad de la prueba para detectar la mutación en volúmenes iniciales de ADN inferiores pone de manifiesto que las muestras pueden contener ADN degradado derivado del proceso de fijación sin que ello afecte el proceso de detección de la mutación. Todos los resultados de la prueba obtenidos con la muestra de BRAF no mutada fueron “Mutation Not Detected”.

Sensibilidad analítica con muestras de FFPET

Para confirmar el nivel de detección del 5 % de la mutación en muestras de pacientes, se procesaron individualmente 24 secciones individuales de 5 µm procedentes de dos muestras de FFPET con mutación V600E en BRAF con niveles de mutación del 6 % y del 11 % mediante los 3 lotes del **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a fin de aislar el ADN. Se prepararon diluciones en serie del ADN de cada sección para crear el conjunto de 8 miembros de panel que se detalla en la Tabla 20.

Tabla 20
Preparación de los miembros del panel de dilución a partir de muestras de FFPET

	% medio de mutación V600E*	Volumen de ADN en miembros del panel de dilución (ng/25 µl)
Muestra 1	6 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Muestra 2	11 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1

* Porcentaje medio de mutación de la muestra determinado mediante secuenciación 454

Se analizaron 8 réplicas de cada miembro del panel con cada uno de los 3 lotes del kit de la prueba **cobas** BRAF (n = 24/miembro del panel). La sensibilidad de cada muestra de FFPET se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó una tasa de resultados “Mutation Detected” para BRAF V600E de como mínimo un 95 % (filas sombreadas). Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21
Sensibilidad de la prueba cobas BRAF con muestras de FFPET

Muestra de FFPET	Porcentaje de mutación mediante secuenciación 454	Volumen de ADN en el miembro del panel	Tasa de resultados “Mutation Detected” (n = 48)
Muestra 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 %
Muestra 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 %

Este estudio ha demostrado que la prueba **cobas** BRAF es capaz de detectar la mutación V600E en BRAF en las muestras de FFPET clínicas actuales cuando el nivel de mutación es ≥ 5 % con un volumen inicial estándar de 125 ng/25 µl. La capacidad de la prueba para detectar la mutación en volúmenes iniciales de ADN inferiores pone de manifiesto que las muestras pueden contener ADN degradado derivado del proceso de fijación sin que ello afecte el proceso de detección de la mutación.

Repetibilidad

Se realizó un estudio para valorar la repetibilidad de la prueba **cobas** BRAF a lo largo de cuatro días de análisis con dos lotes de reactivos, dos usuarios y cinco muestras de FFPET de cáncer papilar de tiroides. Estas muestras de FFPET presentaban diferentes porcentajes de contenido tumoral (entre el 50 y el 70 %) y alelos mutados (entre el 16 y el 22 %), incluidas dos muestras con la mutación V600E con un porcentaje de ~16-18 % ($\sim 3 \times \text{LoD}$). Se alcanzó una tasa de identificación correcta del 100 % de las muestras analizadas (80/80). No se obtuvieron falsos positivos para ninguna de las muestras no mutadas (WT). En resumen, la prueba **cobas** BRAF presentó una repetibilidad elevada en muestras con un contenido tumoral bajo y un porcentaje reducido de alelos mutados en diferentes usuarios, lotes de reactivos y días de análisis.

Correlación con el método de referencia

Para evaluar el rendimiento de la prueba **cobas** BRAF en comparación con la secuenciación bidireccional doble Sanger, se efectuó una secuenciación Sanger en 159 muestras de FFPET de CPT. En la Tabla 22 se muestra el análisis de concordancia principal entre los resultados de la prueba **cobas** BRAF y los resultados de la secuenciación Sanger para la detección de la mutación V600E con uno de los dos lotes de reactivos analizados. El segundo lote arrojó resultados similares, con excepción de una muestra que obtuvo un resultado "Mutation Not Detected". La resolución mediante secuenciación 454 determinó que la muestra contenía un 1,4 % de mutación y estaba por debajo del requisito de sensibilidad del 5 % de la prueba **cobas** BRAF.

Tabla 22
Resumen de los resultados de la prueba cobas BRAF y de la secuenciación Sanger

Prueba cobas BRAF (método de prueba)	Secuenciación Sanger (método de referencia)		
	Mutación V600E en BRAF detectada^a	Mutación V600E en BRAF no detectada^b	Total
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Total	89	70	159
Porcentaje de concordancia de positivos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 88 / 89 = 98,9 % (93,9 %, 99,8 %)		
Porcentaje de concordancia de negativos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 57 / 70 = 81,4 % (70,8 %, 88,8 %)		
Porcentaje de concordancia general (IC al 95 %)	100 % $\times$ 145 / 159 = 91,2 % (85,8 %, 94,7 %)		

^a Un resultado "Mutation Detected" indica la presencia del tipo de mutación en BRAF predominante, V600E, (1799 T>A), según el método Sanger.

^b Un resultado "Mutation Not Detected" indica la ausencia del tipo de mutación en BRAF predominante, V600E, según el método Sanger (p. ej., sin mutación o normal y otras mutaciones).

Nota: IC = (porcentaje) intervalo de confianza

Todas las muestras con resultados discordantes para la prueba **cobas** BRAF y la secuenciación Sanger se sometieron a secuenciación 454 (método cuantitativo de pirosecuenciación masiva en paralelo) como segundo método de referencia. En la Tabla 23 se presenta el análisis de concordancia secundario tras la resolución de los casos discordantes.

Una muestra discordante tenía un resultado "Mutation Not Detected" según la prueba **cobas** BRAF y un resultado V600E según la secuenciación Sanger. El método de secuenciación 454 arrojó un resultado sin mutación concordante con la prueba **cobas** BRAF.

Para doce de las trece muestras discordantes que presentaban una mutación detectada según la prueba **cobas** BRAF y un resultado sin mutación según la secuenciación Sanger, el método de secuenciación 454 identificó una mutación V600E (1,2-19 % de frecuencia alélica), concordante con la prueba **cobas** BRAF.

La muestra discordante restante para la que se había obtenido un resultado de mutación V600E según la prueba **cobas** BRAF generó un resultado sin mutación según la secuenciación Sanger y el método de secuenciación 454. Una investigación adicional con el método de secuenciación 454 confirmó posteriormente que la muestra tenía un porcentaje escaso de mutación V600E.

Tabla 23
Resultados de la prueba cobas BRAF y de la secuenciación Sanger después de la resolución de resultados discordantes mediante secuenciación 454

Prueba cobas BRAF (método de prueba)	Secuenciación Sanger después de la resolución de resultados discordantes mediante secuenciación 454		
	Mutación V600E en BRAF detectada	Mutación V600E en BRAF no detectada	Total
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Total	101	58	159
Porcentaje de concordancia de positivos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 101 / 101 = 100,0 % (96,3 %, 100,0 %)		
Porcentaje de concordancia de negativos (IC al 95 %)	100 % $\times$ 57 / 58 = 98,3 % (90,9 %, 99,7 %)		
Porcentaje de concordancia general (IC al 95 %)	100 % $\times$ 158 / 159 = 99,4 % (96,5 %, 99,9 %)		

LISTA DE AVISOS DE RESULTADOS

Los avisos de resultados se muestran en la pestaña de resultados. El origen de un aviso se indica en el código del mismo tal como se describe en la Tabla 24 a continuación. La Tabla 25 presenta todos los avisos de interpretación de resultados relevantes para el usuario.

Tabla 24
Origen del aviso

Inicio del código del aviso	Origen del aviso	Ejemplo
M*	Múltiples motivos u otros motivos	M6
R	Interpretación de los resultados	R200
Z*	Analizador	Z1

* Consulte el Manual de usuario del **cobas**® 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800 System

Tabla 25
Lista de los avisos de interpretación de resultados

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R200	Error	Control de mutación no válido.	Repita la serie. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica: 1. Un valor de codo observado para el control de mutación se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Esto puede suceder en caso de contaminación del ADN o por un error del algoritmo provocado por un patrón de fluorescencia atípico. 2. Un valor de codo observado para el control de mutación se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Esto puede suceder en las siguientes situaciones 1) preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo, 2) error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo al pocillo de reacción de la placa de PCR, o 3) error de pipeteo al añadir el control de mutación a un pocillo de reacción de la placa de PCR.
R201	Error	Control no mutado no válido.	Repita la serie. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica: 1. Un valor de codo observado para el control no mutado se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Esto puede suceder en caso de contaminación del ADN o por un error del algoritmo provocado por un patrón de fluorescencia atípico. 2. Un valor de codo observado para el control no mutado se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Esto puede suceder en las siguientes situaciones 1) preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo, 2) error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo al pocillo de reacción de la placa de PCR, o 3) error de pipeteo al añadir el control no mutado a un pocillo de reacción de la placa de PCR.

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R202	Error	Ct de mutación no detectado.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica que no se ha observado un valor de codo de mutación para la muestra. Esto puede indicar la ausencia de mutación en la muestra o bien uno o más de los siguientes escenarios: 1. Porcentaje bajo de secuencias de mutación por debajo del límite de detección de la prueba. 2. ADN genómico de baja calidad de la muestra. 3. Procesamiento de muestra inadecuado. 4. Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. 5. Mutaciones poco frecuentes en las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de mutación. 6. Error de pipeteo de la muestra o ADN de la muestra no añadido al pocillo de reacción.
R203	Error	Ct no mutado no detectado.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica que no se ha observado un valor de codo no mutado para la muestra. La ausencia de un valor de codo no mutado sugiere uno o más de los siguientes escenarios: 1. ADN genómico de baja calidad de la muestra. 2. Procesamiento de muestra inadecuado. 3. Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. 4. Mutaciones poco frecuentes en las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas no mutados. 5. Posibilidad de que el ADN de la muestra no se haya añadido a uno o más pocillos.
R204	Error	Ct de mutación fuera de rango.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica: 1. Un valor de codo de mutación observado para la muestra se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Esto puede suceder si la mezcla de PCR tiene una carga significativa de ADN genómico concentrado o si se produce un error del algoritmo por un patrón de fluorescencia atípico, o 2. Un valor de codo de mutación observado para la muestra se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Esto podría indicar uno o más de los siguientes escenarios: • Porcentaje bajo de secuencias de mutación por debajo del límite de detección de la prueba. • Error de pipeteo al añadir el ADN de la muestra al pocillo de reacción. • ADN genómico de baja calidad de la muestra. • Procesamiento de muestra inadecuado. • Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. • Mutaciones poco frecuentes en las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de mutación.

Código del aviso	Importancia	Descripción	Acción recomendada
R205	Error	Ct no mutado fuera de rango.	Repita el análisis de la muestra. Consulte el boletín técnico específico del ensayo. Este código de aviso indica: 1. Un valor de codo no mutado para la muestra se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Esto puede suceder si la mezcla de PCR tiene una carga significativa de ADN genómico concentrado o si se produce un error del algoritmo por un patrón de fluorescencia atípico, o 2. Un valor de codo no mutado observado para la muestra se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Esto podría indicar uno o más de los siguientes escenarios: • Error de pipeteo al añadir el ADN de la muestra al pocillo de reacción. • ADN genómico de baja calidad de la muestra. • Procesamiento de muestra inadecuado. • Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. • Mutaciones poco frecuentes en las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas no mutados.

BIBLIOGRAFÍA

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

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Se han actualizado los apartados USO PREVISTO y RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA sections. Se han añadido los apartados Eficacia clínica de ZELBORAF® (vemurafenib) y Eficacia clínica de COTELLIC® (cobimetinib). Se ha añadido información acerca de la estabilidad de los portaobjetos en el apartado OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS. Se ha añadido una explicación sobre la melanina en el apartado LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO. Se han actualizado aspectos generales de idioma para clarificar y armonizar el documento con el documento IFU US-IVD de la prueba cobas® 4800 BRAF V600 Mutation. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.
11/2019	Se ha corregido el texto “FFFPET” por “FFPET” y la fuente del símbolo “mayor o igual que” en la página 24 para garantizar una correcta visualización del PDF. Se ha actualizado la página de símbolos armonizados. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Se ha eliminado la siguiente información del DNA Sample Preparation Kit: • Listados de reactivos e información de composición • Pasos y notas sobre los pasos de procedimiento Se ha incluido una referencia al cobas® DNA Sample Preparation Kit y a las Instrucciones de uso al comienzo del apartado Limitaciones del procedimiento. Se han actualizado las referencias al sistema y al Manual de usuario de mismo del siguiente modo: “Manual de usuario del cobas® 4800 System o Asistencia al usuario del cobas® 4800 System”. Se han corregido los errores tipográficos y se ha actualizado la redacción para hacerla coherente y asegurar su estandarización a lo largo de las Instrucciones de uso de la versión inglesa. Se ha añadido avisos a los resultados. Se ha actualizado la referencia a la International Air Transport Association. Se ha actualizado la página de símbolos armonizados, el apartado de marcas registradas y patentes y las direcciones de las filiales de distribución. Se ha añadido una frase para clarificar que el etiquetado seguro del producto se realiza conforme a la regulación GHS de la UE. Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.

Fabricado en los Estados Unidos



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

Marcas registradas y patentes

COBAS, COBAS Z y AMPERASE son marcas comerciales de Roche.

El resto de nombres de productos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

La tecnología de prevención de contaminación cruzada de la enzima AmpErase está protegida por la patente estadounidense 7,687,247 propiedad de Life Technologies y con licencia para Roche Molecular Systems, Inc.

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-12



Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.



Software auxiliar



Código de serie



Representante autorizado
en la Comunidad Europea



Riesgo biológico



Hoja de datos del código de barras



Número de catálogo



Consulte las instrucciones de uso



Para evaluación del rendimiento IVD
únicamente



Suficiente para $<n>$ pruebas



Límite inferior del intervalo asignado



Contenido del kit



Fabricante



Distribuido por



Almacenar en la oscuridad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Límite de temperatura



Archivo de definición de pruebas



Fecha de caducidad



Límite superior del intervalo asignado

Rx Only

Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica.



Global Trade Item Number
(número mundial de un artículo comercial)



Fecha de fabricación



Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

Servicio técnico para clientes de EE. UU.: 1-800-526-1247