



Rx Only

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

*In-vitro-Diagnostikum*



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

24 Tests

P/N: 07003986190

Informationen zur Probenvorbereitung für FFPE-Gewebeproben sind dem **cobas<sup>®</sup>** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) zu entnehmen.

# INHALTSVERZEICHNIS

## Verwendungszweck

### Zusammenfassung und Erklärung des Tests

|  |   |
|--|---|
| Hintergrund .....                                | 4 |
| Testprinzipien .....                             | 5 |
| Referenzsequenzen .....                          | 5 |
| Probenvorbereitung .....                         | 6 |
| PCR-Amplifikation .....                          | 6 |
| Wahl der Zielsequenz .....                       | 6 |
| Amplifikation der Zielsequenz .....              | 6 |
| Automatisierte Echtzeit-Mutationsdetektion ..... | 6 |
| Selektive Amplifikation .....                    | 7 |

### Reagenzien und Materialien

|  |   |
|--|---|
| Mit dem cobas® PIK3CA Mutation Test (24 Tests) mitgelieferte Reagenzien (P/N: 07003986190) ..... | 7 |
| Lagerung und Handhabung der Reagenzien .....   | 8 |
| Zusätzlich benötigtes Material .....   | 8 |
| Zusätzlich benötigte Geräte und Software .....   | 8 |

### Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

|  |    |
|--|----|
| Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen .....            | 9  |
| Gute Laborpraxis .....                               | 9  |
| Kontamination .....                                  | 9  |
| Handhabung .....                                     | 10 |
| Entsorgung .....                                     | 10 |
| Verschüttetes Material und Reinigung .....           | 10 |
| Entnahme, Transport und Lagerung von Proben .....    | 10 |
| Probenentnahme .....                                 | 10 |
| Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben ..... | 10 |
| Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben .....  | 11 |

### Testverfahren

|   |    |
|---|----|
| Durchführung des Tests .....            | 11 |
| Gebrauchsanweisung .....                | 12 |
| Kontrollen des gesamten Prozesses ..... | 12 |
| Amplifikation und Detektion .....       | 13 |
| Vorbereitung der Reaktion .....         | 15 |
| Vorbereitung der Platte .....           | 16 |
| Starten der PCR .....                   | 17 |

**Ergebnisse**

|   |    |
|---|----|
| Interpretation der Ergebnisse .....                       | 18 |
| Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis ..... | 18 |
| Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse .....    | 19 |
| Mutationskontrolle .....                                  | 19 |
| Negativkontrolle .....                                    | 19 |
| Verfahrenseinschränkungen .....                           | 19 |

**Nichtklinische Leistungsmerkmale**

|  |    |
|--|----|
| Wichtigste Leistungsmerkmale .....                               | 20 |
| Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze (LoB) .....            | 20 |
| Nachweisgrenze bei FFPE-Gewebeprobemischungen .....              | 21 |
| Nachweis seltener Genotypen unter Verwendung von Plasmiden ..... | 22 |
| Wiederholbarkeit .....   | 22 |
| Korrelation mit der Referenzmethode .....                        | 22 |
| Kreuzreaktivität .....   | 26 |
| Evaluierung potenzieller Störsubstanzen .....                    | 26 |

**Klinische Leistungsmerkmale**

|   |    |
|---|----|
| Klinische Studie zur Reproduzierbarkeit ..... | 27 |
|---|----|

**Ergebnis-Flags**

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Bedeutung der Ergebnis-Flags ..... | 28 |
|------------------------------------|----|

**Weitere Informationen**

|   |    |
|---|----|
| Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays ..... | 30 |
| Symbole .....                                 | 31 |
| Technischer Support .....                     | 33 |
| Herstellung und Vertrieb .....                | 33 |
| Marken und Patente .....                      | 33 |
| Copyright .....                               | 33 |
| Literatur .....                               | 34 |
| Dokumentversion .....                         | 35 |

## Verwendungszweck

Der **cobas**® PIK3CA Mutation Test ist ein Echtzeit-PCR-Test zum qualitativen Nachweis und zur Identifizierung von 17 Mutationen des PIK3CA-Gens – das für die katalytische alpha-Untereinheit der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) codiert – in den Exons 2, 5, 8, 10 und 21 in DNA, die aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe gewonnen wurde. Beim **cobas**® PIK3CA Mutation Test zur Verwendung auf dem **cobas**® 4800 System handelt es sich um einen Echtzeit-PCR-Test zur Identifizierung von Patienten mit metastasierendem Mammakarzinom, deren Tumoren diese Mutationen aufweisen.

## Zusammenfassung und Erklärung des Tests

### Hintergrund

Der PI3K-Signalweg ist ein wichtiger Regulator für viele Funktionen des normalen Zellverhaltens, wie Wachstum, Überleben, Motilität und Proliferation.<sup>1-3</sup> Aktivierung und Fehlregulierung des PI3K-Signalweges korrelieren mit einer Vielzahl menschlicher Krebsarten.<sup>4</sup> Bei der Onkogenese spielt die Aktivierung des Signalwegs über Rezeptoren, die sogenannte Rezeptortyrosinkinase (RTK), eine wesentliche Rolle, wie z. B. der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER-2) oder der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). PI3K, Akt und mTOR beinhalten 3 wesentliche Schnittpunkte im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.<sup>5</sup> Durch die Aktivierung des PI3K-Signalwegs wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) umgewandelt – einen wichtigen sekundären Botenstoff, der eine Vielzahl von Downstream-Effektorwegen stimuliert, wie Akt und mTOR. Die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs setzt viele zelluläre Prozesse in Gang, wie Zellwachstum, -proliferation und -überleben.<sup>6</sup>

Das PIK3CA-Gen ist eines der am stärksten mutierten Onkogene, die man bisher in Krebserkrankungen beim Menschen identifiziert hat. Außerdem betreffen die meisten bekannten Mutationen nur einige wenige Hotspots im Protein (Codons 1047 [40 %], 545 [25 %] und 542 [13 %]).<sup>7</sup> Die meisten Mutationen treten in den Exons 10 und 21 des PIK3CA-Gens auf. Aktivierende Mutationen wurden jedoch auch in den Exons 2, 5 und 8 nachgewiesen. Laut COSMIC-Datenbank ist PIK3CA in Bezug auf alle Tumorarten in durchschnittlich 12 % der Fälle mutiert. Bei Mammakarzinomen wurde hingegen bei 26 % aller getesteten Tumoren eine PIK3CA-Mutation nachgewiesen. Es konnte belegt werden, dass eine PIK3CA-Mutation häufiger bei hormonrezeptorpositiven (ca. 40 %), und HER-2-positiven (ca. 25 %) Mammakarzinomen auftreten.<sup>8,9</sup>

Bei Frauen ist das Mammakarzinom die am häufigsten diagnostizierte Krebsart und die häufigste Todesursache infolge einer Krebserkrankung. Im Jahr 2017 waren bei weiblichen Patienten weltweit 25 % aller Krebserkrankungen und 15 % aller letal verlaufenden Krebserkrankungen auf ein Mammakarzinom zurückzuführen.<sup>10</sup> Etwa die Hälfte aller Erkrankungen und 60 % der letalen Verläufe betrafen Patientinnen in wirtschaftlich entwickelten Ländern. Die Inzidenzraten sind in West- und Nordeuropa, Australien, Neuseeland und Nordamerika im Allgemeinen hoch. Die Unterschiede bezüglich der Inzidenz in den verschiedenen Regionen sind vor allem auf Unterschiede in Bezug auf reproduktive und hormonelle Faktoren sowie den Zugang zu entsprechenden Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen.<sup>11</sup> Um der hohen Inzidenz von Mammakarzinomen und der hohen Anzahl letaler Verläufe entgegenzuwirken, bedarf es neuer Therapien. Die Kenntnis des Mutationsstatus von PIK3CA ist für die Durchführung von Therapien, die auf die Aktivität des PIK3CA-Signalwegs abzielen, von wesentlicher Bedeutung.

Die mit dem **cobas**® PIK3CA Mutation Test (**cobas** PIK3CA-Test) nachweisbaren Mutationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Mit dem cobas® PIK3CA-Test nachgewiesene Mutationen

| Aktuelle PIK3CA-Exon-Nummer | Vorherige PIK3CA-Exon-Nummer* | PIK3CA-Mutation | PIK3CA-Nukleinsäuresequenz | HGVS**-Proteinnomenklatur  | HGVS**-Nukleotidnomenklatur | COSMIC-ID <sup>12</sup> |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 2                           | 1                             | R88Q            | 263G>A                     | NM_006218.2:p.(Arg88Gln)   | NM_006218.2:c.263G>A        | 746                     |
| 5                           | 4                             | N345K           | 1035T>A                    | NM_006218.2:p.(Asn345Lys)  | NM_006218.2:c.1035T>A       | 754                     |
| 8                           | 7                             | C420R           | 1258T>C                    | NM_006218.2:p.(Cys420Arg)  | NM_006218.2:c.1258T>C       | 757                     |
| 10                          | 9                             | E542K           | 1624G>A                    | NM_006218.2:p.(Glu542Lys)  | NM_006218.2:c.1624G>A       | 760                     |
| 10                          | 9                             | E545A           | 1634A>C                    | NM_006218.2:p.(Glu545Ala)  | NM_006218.2:c.1634A>C       | 12458                   |
| 10                          | 9                             | E545D           | 1635G>T                    | NM_006218.2:p.(Glu545Asp)  | NM_006218.2:c.1635G>T       | 765                     |
| 10                          | 9                             | E545G           | 1634A>G                    | NM_006218.2:p.(Glu545Gly)  | NM_006218.2:c.1634A>G       | 764                     |
| 10                          | 9                             | E545K           | 1633G>A                    | NM_006218.2:p.(Glu545Lys)  | NM_006218.2:c.1633G>A       | 763                     |
| 10                          | 9                             | Q546E           | 1636C>G                    | NM_006218.2:p.(Gln546Glu)  | NM_006218.2:c.1636C>G       | 6147                    |
| 10                          | 9                             | Q546K           | 1636C>A                    | NM_006218.2:p.(Gln546Lys)  | NM_006218.2:c.1636C>A       | 766                     |
| 10                          | 9                             | Q546L           | 1637A>T                    | NM_006218.2:p.(Glu546Leu)  | NM_006218.2:c.1637A>T       | 25041                   |
| 10                          | 9                             | Q546R           | 1637A>G                    | NM_006218.2:p.(Gln546Arg)  | NM_006218.2:c.1637A>G       | 12459                   |
| 21                          | 20                            | H1047L          | 3140A>T                    | NM_006218.2:p.(His1047Leu) | NM_006218.2:c.3140A>T       | 776                     |
| 21                          | 20                            | H1047R          | 3140A>G                    | NM_006218.2:p.(His1047Glu) | NM_006218.2:c.3140A>G       | 775                     |
| 21                          | 20                            | H1047Y          | 3139C>T                    | NM_006218.2:p.(His1047Tyr) | NM_006218.2:c.3139C>T       | 774                     |
| 21                          | 20                            | G1049R          | 3145G>C                    | NM_006218.2:p.(Gly1049Glu) | NM_006218.2:c.3145G>C       | 12597                   |
| 21                          | 20                            | M1043I          | 3129G>T                    | NM_006218.2:p.(Met1043Ile) | NM_006218.2:c.3129G>A       | 773                     |

\* Vorherige PIK3CA-Exon-Nummer: ohne das erste untranslatierte Exon

\*\* HGVS: Human Genome Variation Society

## Testprinzipien

Der **cobas** PIK3CA-Test umfasst zwei Hauptprozesse: (1) manuelle Probenvorbereitung zur Gewinnung der genomischen DNA aus FFPE-Gewebe und (2) PCR-Amplifikation und Detektion der Ziel-DNA unter Verwendung von komplementären Primer-Paaren und Oligonukleotidsonden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Der Test dient dem Nachweis von R88Q in Exon 2, N345K in Exon 5, C420R in Exon 8, E542K, E545X (E545A, E545D\*, E545G und E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L und Q546R) in Exon 10 und M1043I\*\*, H1047X (H1047L, H1047R und H1047Y) und G1049R in Exon 21. Der Mutationsnachweis wird mittels PCR-Analyse mit dem **cobas z 480** Analyzer durchgeführt. Zur Bestätigung der Gültigkeit des Laufs werden mit jedem Lauf eine Mutationskontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt.

\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz E545D können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.1635G>T nachgewiesen werden.

\*\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz M1043I können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.3129G>T nachgewiesen werden.

## Referenzsequenzen

Die Referenzsequenzen für PIK3CA finden Sie in der folgenden Quelle.<sup>13</sup>

**PIK3CA: LRG\_310t1**

## Probenvorbereitung

Die Verarbeitung der FFPE-Gewebeproben und die Isolierung der genomischen DNA erfolgen mit dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit. Dabei handelt es sich um eine generische, manuelle Probenvorbereitung, die auf der Bindung der Nukleinsäuren an Glasfasern beruht. Ein entparaffinierter 5-µm-Gewebeschnitt einer FFPE-Gewebeprobe wird durch die Inkubation bei erhöhter Temperatur mit einer Protease und einem chaotropen Lyse-/Bindungspuffer lysiert. Dabei werden Nukleinsäuren freigesetzt und die freigesetzte genomische DNA vor DNasen geschützt. Anschließend wird der Lysemischung Isopropanol zugegeben, die dann durch eine Säule mit Glasfaser-Filtereinsatz zentrifugiert wird. Beim Zentrifugieren wird die genomische DNA an der Oberfläche des Glasfaserfilters gebunden. Außerdem werden durch das Zentrifugieren ungebundene Substanzen wie Salze, Proteine und andere Zellverunreinigungen entfernt. Die adsorbierten Nukleinsäuren werden gewaschen und anschließend mit einer wässrigen Lösung eluiert. Die genomische DNA wird mittels Spektralphotometrie quantitativ bestimmt und auf eine bestimmte Konzentration eingestellt, die dem Amplifikations-/Detektionsgemisch zugefügt wird. Die Ziel-DNA wird anschließend unter Verwendung der Amplifikations- und Detektionsreagenzien des **cobas** PIK3CA-Testkits mit dem **cobas z 480** Analyser amplifiziert und detektiert.

## PCR-Amplifikation

### Wahl der Zielsequenz

Beim **cobas** PIK3CA-Test wird ein Primer-Pool verwendet, der auf spezifischen Basenpaarsequenzen (85 bis 155 Basenpaare) in den PIK3CA-Exons 2, 5, 8, 10 und 21 beruht. Ein zusätzliches Primer-Paar hat eine konservierte Region aus 167 Basenpaaren in PIK3CA-Exon 4 zum Ziel, um eine umfassende Prozesskontrolle für Probeneignung, Extraktion und Amplifikation bereitzustellen. Die Amplifikation erfolgt nur in den von den Primern begrenzten Regionen des PIK3CA-Gens; es wird nicht das gesamte PIK3CA-Gen amplifiziert.

### Amplifikation der Zielsequenz

Für die Amplifikation der Zielsequenz wird DNA-Polymerase eines Abkömmlings der *Thermus*-Spezies Z05-AS1 verwendet. Das PCR-Reaktionsgemisch wird zuerst erwärmt, um die genomische DNA zu denaturieren und die Primer-Zielsequenzen freizulegen. Beim Abkühlen des Gemischs lagern sich die Upstream- und Downstream-Primer an die Ziel-DNA-Sequenzen an. Die Z05-AS1-DNA-Polymerase verlängert in der Gegenwart zweiwertiger Metallionen und eines Überschusses an dNTPs die angelagerten Primer, wodurch ein zweiter DNA-Strang synthetisiert wird. Mit Abschluss dieses ersten PCR-Zyklus liegt nun eine doppelsträngige DNA-Kopie vor, die die Basenpaar-Zielregionen des PIK3CA-Gens enthält. Dieser Prozess wird für eine Reihe von Zyklen wiederholt, wobei jeder Zyklus die Menge an Ziel-DNA in Form von Amplifikaten effektiv verdoppelt.

### Automatisierte Echtzeit-Mutationsdetektion

Der **cobas** PIK3CA-Test basiert auf Echtzeit-PCR-Technologie. Jede für eine Zielsequenz spezifische Oligonukleotidsonde wird in der Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der als Reporter dient, und mit einem Quencher-Molekül, das die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffes in einer intakten Sonde absorbiert. Während jedes Amplifikationszyklus wird eine Sonde, die zur einsträngigen DNA-Sequenz im Amplifikat komplementär ist, gebunden und anschließend durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase Z05-AS1 abgespalten. Nachdem der Reporter-Farbstoff durch diese Nukleaseaktivität vom Quencher abgespalten wurde, kann Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge gemessen werden, wenn der Reporter-Farbstoff durch das entsprechende Lichtspektrum angeregt wird. Die Ziel-PIK3CA-Sequenzen des Tests werden mit vier verschiedenen Reporterfarbstoffen markiert. Die Amplifikation der PIK3CA-Zielsequenzen wird durch die Messung der Fluoreszenz an den vier charakteristischen Wellenlängen in dedizierten optischen Kanälen unabhängig voneinander in drei Reaktionen nachgewiesen.

## Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure aus der Probe wird beim **cobas** PIK3CA-Test durch die Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht.<sup>14</sup> Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridinhaltige – nicht aber desoxythymidinhaltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, jedoch in den Amplifikaten immer vorhanden, da dUTP neben Desoxythymidintriphosphat als eines der Nukleotid-Triphosphate im Master-Mix verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplifikate Desoxyuridin. Vor der Amplifikation der Ziel-DNA werden kontaminierende Amplifikate durch das Desoxyuridin anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Das im Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridinhaltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermozyklischen Schritt bei alkalischem pH-Wert tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplifikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase ist bei Temperaturen über 55 °C, d. h. während aller thermozyklischen Schritte, inaktiv und zerstört deshalb keine Zielamplifikate.

## Reagenzien und Materialien

Alle ungeöffneten Reagenzien und Kontrollen sind gemäß den Empfehlungen in der Tabelle „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ zu lagern.

### Mit dem cobas® PIK3CA Mutation Test (24 Tests) mitgelieferte Reagenzien (P/N: 07003986190)

| Reagenzien   | Reagenzienbestandteile   | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise |
|--|--|--------------|----------------------------------|
| <b>PIK3CA MMX-1</b><br>( <b>PIK3CA Master Mix 1;</b><br><b>Deckel mit weißem Knopf</b> )<br>(P/N: 07003897001)     | Tris-Puffer, Kaliumchlorid, Glycerin, EDTA, nichtionogenes Detergens, Dimethylsulfoxid, 0,09 % Natriumazid, dNTPs, DNA-Polymerase, AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), Aptamer, PIK3CA-Primer, fluoreszenzmarkierte PIK3CA-Sonden | 2 × 0,48 ml  | k. A.                            |
| <b>PIK3CA MMX-2</b><br>( <b>PIK3CA Master Mix 2;</b><br><b>Deckel mit goldenem Knopf</b> )<br>(P/N: 07003927001)   | Tris-Puffer, Kaliumchlorid, Glycerin, EDTA, nichtionogenes Detergens, Dimethylsulfoxid, 0,09 % Natriumazid, dNTPs, DNA-Polymerase, AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), Aptamer, PIK3CA-Primer, fluoreszenzmarkierte PIK3CA-Sonden | 2 × 0,48 ml  | k. A.                            |
| <b>PIK3CA MMX-3</b><br>( <b>PIK3CA Master Mix 3;</b><br><b>Deckel mit blaugrünem Knopf</b> )<br>(P/N: 07003943001) | Tris-Puffer, Kaliumchlorid, Glycerin, EDTA, nichtionogenes Detergens, Dimethylsulfoxid, 0,09 % Natriumazid, dNTPs, DNA-Polymerase, AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), Aptamer, PIK3CA-Primer, fluoreszenzmarkierte PIK3CA-Sonden | 2 × 0,48 ml  | k. A.                            |
| <b>MGAC</b><br>( <b>Magnesiumacetat; Deckel mit gelbem Knopf</b> )<br>(P/N: 05854326001)                           | Magnesiumacetat, 0,09 % Natriumazid  | 6 × 0,20 ml  | k. A.                            |
| <b>PIK3CA MC</b><br>( <b>PIK3CA-Mutationskontrolle;</b><br><b>Deckel mit rotem Knopf</b> )<br>(P/N: 07003960001)   | Tris-Puffer, EDTA, Poly-rA-RNA (synthetisch), 0,05 % Natriumazid, Plasmid-DNA mit PIK3CA-Sequenzen (Exons 2, 5, 8, 10 und 21), PIK3CA-Wildtyp-DNA  | 6 × 0,10 ml  | k. A.                            |
| <b>DNA SD</b><br>( <b>DNA-Probenverdünnungslösung</b> )<br>(P/N: 05854474001)                                      | Tris-HCl-Puffer, 0,09 % Natriumazid  | 2 × 3,5 ml   | k. A.                            |

## Lagerung und Handhabung der Reagenzien

| Reagenz                      | Lagertemperatur | Lagerdauer  |
|------------------------------|-----------------|---|
| cobas® PIK3CA Mutation Test* | 2 °C bis 8 °C   | Geöffnet für 4 Anwendungen über 90 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum haltbar. |

\* **PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3** und Gebrauchs-MMX (hergestellt durch Zugabe von **MGAC** zu **PIK3CA MMX-1** oder **PIK3CA MMX-2** oder **PIK3CA MMX-3**) sind über längere Zeiträume lichtgeschützt aufzubewahren. Der Gebrauchs-MMX muss bei 2 °C bis 8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden. Die vorbereiteten Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Zubereitung des Gebrauchs-MMX zugegeben werden. Mit der Amplifikation muss innerhalb von 1 Stunde nach der Zugabe der bearbeiteten Proben und Kontrollen zum Gebrauchs-MMX begonnen werden.

## Zusätzlich benötigtes Material

| Materialien  | P/N   |
|--|---|
| Bleiche  | Beliebiger Hersteller                                 |
| 70%iges Ethanol  | Beliebiger Hersteller                                 |
| Mikrotiterplatte für das <b>cobas®</b> 4800 System und Versiegelungsfolie  | Roche 05232724001                                     |
| Versiegelungsfolienwerkzeug für das <b>cobas®</b> 4800 System (bei der Installation des <b>cobas®</b> 4800 Systems bereitgestellt) | Roche 04900383001                                     |
| Verstellbare Pipetten* (Kapazität von 5–1000 µl)   | Beliebiger Hersteller                                 |
| DNase-freie Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Spitzen  | Beliebiger Hersteller                                 |
| Tischmikrozentrifuge* (mit einer Zentrifugalkraft von 20.000 × g)  | Eppendorf 5430 oder 5430R oder gleichwertiges Produkt |
| Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss (1,5 ml, steril, RNase-/DNase-frei, PCR-Qualität)                                   | Beliebiger Hersteller                                 |
| Mikrozentrifugenröhrchen-Racks   | Beliebiger Hersteller                                 |
| Spektralphotometer zum Messen der DNA-Konzentration*   | Beliebiger Hersteller                                 |
| Vortexer*  | Beliebiger Hersteller                                 |
| Laborhandschuhe, puderfrei   | Beliebiger Hersteller                                 |

\* Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gepflegt und gewartet werden.

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

## Zusätzlich benötigte Geräte und Software

| Zusätzlich benötigte Geräte und Software   | P/N         |
|--|-------------|
| <b>cobas z</b> 480 Analyzer und Control Unit                                       | 05200881001 |
| Anwendungssoftware (Core) Version 2.2 oder höher für das <b>cobas®</b> 4800 System | 07565500001 |
| <b>cobas®</b> PIK3CA P1 Analysis Package Software, Version 1.0 oder höher          | 08249628001 |

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

# Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests.

- Nur zur Verwendung als *in vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Dieser Test ist mit FFPE-Gewebeproben durchzuführen. Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“<sup>15</sup> und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben, zu behandeln.<sup>16</sup>
- Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und DNase-freie Pipettenspitzen zu verwenden.

## Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Beim Umgang mit Reagenzien Schutzbrille, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.

**Hinweis:** *Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung.*

## Kontamination

- Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Handschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und cobas PIK3CA-Testreagenzien gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit Proben nicht kontaminiert werden.
- Handschuhe regelmäßig wechseln, um das Kontaminationsrisiko zu senken.
- Die Handschuhe müssen vor dem Verlassen von DNA-Isolierungsbereichen gewechselt werden oder wenn ein Verdacht auf Kontakt mit Lösungen oder einer Probe besteht.
- Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen vermeiden.
- Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Gebrauchs-MMX gründlich zu reinigen. Die Geräte und Materialien sollten den verschiedenen Arbeiten fest zugewiesen werden; sie dürfen dann nicht mehr für andere Arbeiten verwendet oder in einen anderen Bereich gebracht werden. So dürfen für die DNA-Isolierung verwendete Pipetten und Verbrauchsmaterialien zum Beispiel nicht für die Vorbereitung von Reagenzien für die Amplifikation und Detektion verwendet werden.
- Die Arbeitsabläufe im Labor sind so zu gestalten, dass sie nur in eine Richtung verlaufen, d. h. ein Arbeitsgang wird abgeschlossen, bevor der nächste gestartet wird. So sollte beispielsweise die DNA-Isolierung abgeschlossen sein, bevor Amplifikation und Detektion gestartet werden. Darüber hinaus ist die DNA-Isolierung in einem Bereich durchzuführen, der von Amplifikation und Detektion räumlich getrennt ist. Um eine Kontamination des gebrauchsfertigen Master-Mix mit DNA-Proben zu vermeiden, ist der zur Amplifikation und Detektion verwendete Arbeitsbereich vor der Vorbereitung des Master-Mix gründlich zu reinigen.

## Handhabung

- Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen nicht vermischen.
- Reagenzfläschchen aus verschiedenen Kitchargen nicht kombinieren.
- Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. Nicht wiederverwenden.
- Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gewartet werden.

## Entsorgung

1. **MGAC, PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3, PIK3CA MC** und **DNA SD** enthalten Natriumazid. Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
2. Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.

## Verschüttetes Material und Reinigung

- Wenn im **cobas® 4800** instrument Flüssigkeit verschüttet wird, die Reinigungsanweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems befolgen.
- Zum Reinigen des **cobas z 480** Analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Den **cobas z 480** Analyzer gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems reinigen.
- Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für den **cobas z 480** Analyzer sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

## Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

*Hinweis: Alle Proben wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.*

### Probenentnahme

BC-FFPE-Gewebeproben (BC: Breast Cancer) wurden für die Verwendung mit dem **cobas** PIK3CA-Test validiert.

### Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben

BC-FFPE-Gewebeproben können bei 15 °C bis 30 °C transportiert werden. Beim Transport von BC-FFPE-Gewebeproben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.<sup>17</sup>

Für BC-FFPE-Gewebeproben wurde bei einer Lagerung bei 15 °C bis 30 °C eine Haltbarkeit von bis zu 12 Monaten nach der Probenentnahme nachgewiesen. Auf Objektträger aufgezogene 5-µm-Gewebeschnitte können bei 15 °C bis 30 °C bis zu 60 Tage gelagert werden.

BC-FFPE-Gewebeprobe sind wie folgt haltbar:

| Art der FFPE-Gewebeprobe                    | FFPE-Gewebeprobeblock | 5-µm-FFPE-Gewebeschnitt |
|---|-----------------------|-------------------------|
| <b>Lagertemperatur für FFPE-Gewebeprobe</b> | 15 °C bis 30 °C       | 15 °C bis 30 °C         |
| <b>Lagerdauer</b>                           | Max. 12 Monate        | Max. 60 Tage            |

## Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben

Verarbeitete Proben (extrahierte DNA) sind wie folgt haltbar:

| Lagertemperatur für extrahierte DNA | -15 °C bis -25 °C  | 2 °C bis 8 °C | 15 °C bis 30 °C |
|-------------------------------------|--|---------------|-----------------|
| <b>Lagerdauer</b>                   | Max. 3 Einfrier-Auftau-Zyklen in einem Zeitraum von 60 Tagen | Max. 14 Tage  | Max. 1 Tag      |

Extrahierte DNA sollte innerhalb des empfohlenen Lagerzeitraums bzw. spätestens vor Erreichen des Verfallsdatums des cobas® DNA Sample Preparation Kits, mit dem die DNA extrahiert wurde, verwendet werden.

# Testverfahren

## Durchführung des Tests

**Abbildung 1: Arbeitsablauf des cobas PIK3CA-Tests mit dem cobas® DNA Sample Preparation Kit**

| Schritt | Arbeitsablauf  |
|---------|--|
| 1       | System einschalten.  |
| 2       | Wartung des Instruments durchführen.                       |
| 3       | Proben und Reagenzien aus der Lagerung nehmen.             |
| 4       | Proben entparaffinieren.                                   |
| 5       | DNA-Isolierung durchführen.                                |
| 6       | DNA eluieren.  |
| 7       | Arbeitsliste erstellen und Plattenanordnung drucken.       |
| 8       | Amplifikationsreagenzien vorbereiten.                      |
| 9       | Amplifikationsreagenzien auf die Mikrotiterplatte geben.   |
| 10      | Probe auf die Mikrotiterplatte geben.                      |
| 11      | Mikrotiterplatte versiegeln.                               |
| 12      | Mikrotiterplatte in den <b>cobas z 480</b> Analyzer laden. |
| 13      | Lauf starten.  |
| 14      | Ergebnisse überprüfen.                                     |
| 15      | Mit LIS: Ergebnisse an LIS übertragen.                     |
| 16      | Analyzer leeren.   |

## Gebrauchsanweisung

**Hinweis:** Es dürfen nur BC-FFPE-Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 µm und mindestens 10 % Tumorgehalt des Gewebeareals für den **cobas** PIK3CA-Test verwendet werden. Alle Proben, deren Tumorgehalt weniger als 10 % des Gewebeareals beträgt, müssen nach der Entparaffinierung einer Makrodissektion unterzogen werden.

**Hinweis:** Detaillierte Anweisungen zum Betrieb des **cobas z 480** Analyzers sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

### Umfang eines Laufs

Ein einzelner Lauf kann pro Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten 1 bis 30 Proben (zuzüglich Kontrollen) umfassen. Bei der Analyse von mehr als 24 Proben werden mehrere **cobas** PIK3CA-Testkits benötigt.

Der **cobas** PIK3CA-Test enthält ausreichend Reagenzien für 8 Läufe mit je 3 Proben (zuzüglich Kontrollen) für ein Maximum von 24 Proben pro Kit.

### Kontrollen des gesamten Prozesses

Für diesen Test wird eine Negativkontrolle (**NEG**) für den gesamten Prozess benötigt. Für jeden Lauf eine Negativkontrolle (**NEG**) zu den Proben mitführen, beginnend mit der DNA-Isolierung.

### DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus BC-FFPE-Gewebeproben erfolgt mithilfe des **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

### Makrodissektion

Wenn der Tumorgehalt der Probe weniger als 10 % des Gewebeareals beträgt, muss die Probe im Rahmen der Probenvorbereitung einer Makrodissektion unterzogen werden.

### DNA-Quantifizierung

**Hinweis:** Die DNA-Konzentration muss unmittelbar nach der DNA-Isolierung und vor der Lagerung gemessen werden.

**Hinweis:** Die DNA-Stammlösung gemäß den Angaben im Abschnitt **Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben** aufbewahren.

1. Jede DNA-Stammlösung 5 Sekunden lang vortexen.
2. Die DNA mit einem Spektralphotometer gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifizieren. DNA-Elutionspuffer (**DNA EB**) als Leerprobe für das Gerät verwenden. Es wird ein Mittelwert aus zwei konsistenten Messwerten benötigt. Die beiden Messungen dürfen nicht um mehr als ±10 % voneinander abweichen, wenn die DNA-Konzentrationen bei ≥ 20,0 ng/µl liegen. Bei DNA-Konzentrationen < 20,0 ng/µl dürfen die beiden Messungen nicht um mehr als ±2 ng/µl voneinander abweichen. Wenn die beiden Messungen bei gemessenen DNA-Konzentrationen ≥ 20,0 ng/µl um mehr als ±10 % oder bei gemessenen DNA-Konzentrationen < 20,0 ng/µl um mehr als ±2 ng/µl voneinander abweichen, müssen 2 zusätzliche Messungen durchgeführt werden, bis die Anforderungen erfüllt werden. In diesem Fall muss der Mittelwert aus diesen beiden neuen Messungen berechnet werden.

**Hinweis:** Die DNA-Stammlösung von der verarbeiteten Negativkontrolle (**NEG**) muss nicht gemessen werden.

3. Die Konzentration der DNA-Stammlösung von den Proben muss  $\geq 2$  ng/ $\mu$ l betragen, damit der **cobas** PIK3CA-Test durchgeführt werden kann. Pro Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen mit jeweils 25  $\mu$ l einer 2-ng/ $\mu$ l-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 50 ng DNA) durchgeführt.

**Hinweis:** Jede DNA-Stammlösung muss eine Konzentration von mindestens 2 ng/ $\mu$ l aufweisen, damit der **cobas** PIK3CA-Test durchgeführt werden kann. Wenn die Konzentration einer DNA-Stammlösung  $< 2$  ng/ $\mu$ l beträgt, die Entparaffinierung, DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung für diese Probe unter Verwendung von zwei 5- $\mu$ m-FFPE-Gewebeschnitten wiederholen. Bei aufgezogenen Proben die Gewebe von beiden Gewebeschnitten nach der Entparaffinierung zusammen in ein Röhrchen geben, das Gewebe in DNA-Gewebe-Lysepuffer (DNA TLB) + Proteinase K (PK) eintauchen und wie oben beschrieben die DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Bei nicht aufgezogenen Proben die zwei Gewebeschnitte zusammen in ein Röhrchen geben und die Entparaffinierung durchführen. Das Gewebe in DNA TLB + PK eintauchen und dann wie oben beschrieben die DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Wenn die Konzentration der DNA-Stammlösung weiterhin  $< 2$  ng/ $\mu$ l ist, einen anderen FFPE-Gewebepräparat vom Klinikauftraggeber anfordern.

## Amplifikation und Detektion

**Hinweis:** Um eine Kontamination des Gebrauchs-MMX mit DNA-Proben zu vermeiden, sind Amplifikation und Detektion in einem anderen Bereich als die DNA-Isolierung durchzuführen. Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Gebrauchs-MMX gründlich zu reinigen. Zur optimalen Reinigung sind alle Oberflächen sowie die Racks und Pipetten zunächst mit einer 0,5%igen Natriumhypochlorit-Lösung und anschließend mit einer 70%igen Ethanollösung gründlich abzuwischen. Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung.

## Analyzer-Setup

Detaillierte Anweisungen zum Setup des **cobas z 480** Analyzers sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

## Einrichtung der Testanforderung

Detaillierte Anweisungen zum Arbeitsablauf des **cobas** PIK3CA-Tests sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

Eine Plattenübersicht mit den Positionen aller Proben und Kontrollen des Laufs erstellen. Die Mutationskontrolle (MC) wird in die Positionen A01 bis A03 auf der Platte geladen. Die Negativkontrolle (**NEG**) wird in die Positionen B01 bis B03 auf der Platte geladen. Die verdünnten Proben werden dann von C01–C03 bis H10–H12 in Gruppen von 3 Spalten zugegeben (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Anordnung der Platte für den cobas PIK3CA-Test**

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

Legende: MC = Mutationskontrolle; NEG = Negativkontrolle; S Nr. = Proben-ID; MMX Nr. = Master-Mix-Reagenz 1, 2 oder 3

**Hinweis:** Jede Probe muss auf drei zusammenhängende Spalten in einer Reihe aufgeteilt werden, um ein Ergebnis zu erhalten.

**Hinweis:** Gebrauchs-Master-Mix 1 muss in die Spalten 01, 04, 07 und 10 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 2 muss in die Spalten 02, 05, 08 und 11 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 3 muss in die Spalten 03, 06, 09 und 12 der Platte geladen werden.

**Hinweis:** Es können bis zu 30 Proben auf eine einzelne Platte geladen werden. Wenn zur Verarbeitung aller Proben auf der Platte mehrere Reagenzkits benötigt werden, müssen diese alle aus der gleichen Charge stammen.

## Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung

### Berechnung der Verdünnung der DNA-Stammlösung für Konzentrationen von 2 ng/µl bis 36 ng/µl

**Hinweis:** Die DNA-Stammlösungen von den Proben müssen unmittelbar vor der Amplifikation und Detektion verdünnt werden.

**Hinweis:** Für jede Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen durchgeführt, für die ein Volumen von insgesamt 75 µl (jeweils 25 µl für jede der drei Reaktionen) einer 2-ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 150 ng DNA) benötigt wird.

1. Für jede Probe das Volumen (µl) der benötigten DNA-Stammlösung berechnen:

$$\mu\text{l der DNA-Stammlösung} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{Konzentration der DNA-Stammlösung [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Für jede Probe das Volumen (µl) der benötigten DNA SD berechnen:

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

Beispiel:

$$\text{Konzentration der DNA-Stammlösung} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

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

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

## Berechnung der Verdünnung der DNA-Stammlösung für Konzentrationen > 36 ng/µl

**Hinweis:** Die DNA-Stammlösungen von den Proben müssen unmittelbar vor der Amplifikation und Detektion verdünnt werden.

**Hinweis:** Für jede Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen durchgeführt, für die ein Volumen von insgesamt 75 µl (jeweils 25 µl für jede der drei Reaktionen) einer 2-ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 150 ng DNA) benötigt wird.

1. Für Konzentrationen der DNA-Stammlösung von > 36 ng/µl die Menge der **DNA SD**, die zur Herstellung von mindestens 90 µl der verdünnten DNA-Stammlösung benötigt wird, anhand der folgenden Formel berechnen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass für jede Probe mindestens 5 µl der DNA-Stammlösung verwendet werden.
2. Für jede Probe das Volumen (µl) von **DNA SD** berechnen, das zum Verdünnen von 5 µl DNA-Stammlösung auf 2 ng/µl benötigt wird:

$$\text{Benötigtes DNA SD-Volumen in } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l DNA-Stammlösung} \times \text{Konzentration der DNA-Stammlösung in ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Beispiel:

Konzentration der DNA-Stammlösung = 100 ng/µl

1. Benötigtes **DNA SD**-Volumen in µl =  $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. 5 µl der DNA-Stammlösung mit dem berechneten Volumen von **DNA SD** verdünnen.

## Probenverdünnung

1. Die erforderliche Anzahl von 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss für die DNA-Verdünnungen mit den jeweiligen Probenbezeichnungen beschriften.
2. Mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Spitze das berechnete Volumen von **DNA SD** in die beschrifteten Röhrchen pipettieren. 45 µl **DNA SD** in ein mit **NEG** beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss pipettieren.
3. Jede DNA-Stammlösung und die **Negativkontrolle** 5 bis 10 Sekunden lang vortexen.
4. Das berechnete Volumen jeder DNA-Probenstammlösung mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Pipettenspitze (für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze verwenden) vorsichtig in die jeweiligen Röhrchen mit **DNA SD** pipettieren. 45 µl **NEG** (extrahiertes Eluat) in das **NEG**-Röhrchen pipettieren.
5. Die Röhrchen verschließen und jeweils 5 bis 10 Sekunden lang vortexen.
6. Die Handschuhe wechseln.

## Vorbereitung der Reaktion

### Herstellung der Gebrauchs-Master-Mixe (MMX-1, MMX-2 und MMX-3)

**Hinweis:** **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2**, **PIK3CA MMX-3** und Gebrauchs-MMX sind lichtempfindlich und müssen über längere Zeiträume lichtgeschützt aufbewahrt werden.

**Hinweis:** Aufgrund der Viskosität der **PIK3CA**-Reagenzien und des Gebrauchs-MMX langsam pipettieren, um sicherzustellen, dass das gesamte Gemisch von der Spitze dispensiert wird.

**Hinweis:** **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** und **PIK3CA MMX-3** können einen hellblauen bzw. violetten Farbton aufweisen. Die Leistung der Reagenzien wird dadurch nicht beeinträchtigt.

In separaten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss drei Gebrauchs-MMX herstellen: einen mit **PIK3CA MMX-1**, einen mit **PIK3CA MMX-2** und einen mit **PIK3CA MMX-3**.

1. Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** bzw. **PIK3CA MMX-3** anhand der folgenden Formel berechnen:

Benötigtes Volumen von **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** oder **PIK3CA MMX-3** = (Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1) × 20 µl

2. Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von **MGAC** anhand der folgenden Formel berechnen:

Benötigtes Volumen von **MGAC** = (Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1) × 7 µl

Mit Hilfe von Tabelle 3 kann auf der Grundlage der Probenanzahl in einem Lauf das Volumen jedes Reagenzes bestimmt werden, das zur Herstellung des Gebrauchs-MMX benötigt wird.

**Tabelle 3: Volumina der benötigten Reagenzien zur Herstellung von Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 auf Grundlage der Anzahl an getesteten Proben\***

| Reagenz | Volumen                           | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|---------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MMX     | 20 µl                             | 80  | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 240 | 260 |
| MGAC    | 7 µl                              | 28  | 35  | 42  | 49  | 56  | 63  | 70  | 77  | 84  | 91  |
| -       | Gesamtvol. pro Gebrauchs-MMX (µl) | 108 | 135 | 162 | 189 | 216 | 243 | 270 | 297 | 324 | 351 |

\* Die Volumina für die Anzahl der Proben basieren auf der Summe der Proben + 2 Kontrollen + 1

3. Die benötigte Anzahl von Fläschchen mit **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** oder **PIK3CA MMX-3** und **MGAC** aus der Lagerung bei 2 °C bis 8 °C entnehmen. Jedes Reagenz vor dem Gebrauch 5 Sekunden lang vortexen und die Flüssigkeit unten im Röhrchen sammeln. Ein steriles Mikrozentrifugenröhrchen für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 kennzeichnen.
4. Das berechnete Volumen von **PIK3CA MMX-1**, **PIK3CA MMX-2** bzw. **PIK3CA MMX-3** in die jeweiligen Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.
5. Das berechnete Volumen von **MGAC** in die Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.
6. Die Röhrchen 3 bis 5 Sekunden lang vortexen, um die erforderliche Homogenität zu gewährleisten.

**Hinweis:** Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Herstellung der Gebrauchs-MMX auf die Mikrotiterplatte gegeben werden.

**Hinweis:** Es dürfen nur die Mikrotiterplatte und Versiegelungsfolie für das **cobas® 4800** System verwendet werden.

## Vorbereitung der Platte

1. Jeweils 25 µl Gebrauchs-MMX in jede Reaktionskavität der Mikrotiterplatte geben, die für den Lauf benötigt wird. Die Pipettenspitze darf die Platte außerhalb der Kavität nicht berühren.
- Gebrauchs-MMX-1 (mit **PIK3CA MMX-1**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 01, 04, 07 und 10 geben.
  - Gebrauchs-MMX-2 (mit **PIK3CA MMX-2**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 02, 05, 08 und 11 geben.
  - Gebrauchs-MMX-3 (mit **PIK3CA MMX-3**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 03, 06, 09 und 12 geben.

2. 25 µl **PIK3CA MC** in die Kavitäten **A01**, **A02** und **A03** der Mikrotiterplatte geben; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.
3. Mit einer neuen Pipettenspitze 25 µl **NEG** in die Kavitäten **B01**, **B02** und **B03** der Mikrotiterplatte pipettieren; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.

**Hinweis:** Bei jedem Lauf muss **PIK3CA MC** in den Kavitäten **A01**, **A02** und **A03** sowie **NEG** in den Kavitäten **B01**, **B02** und **B03** mitgeführt werden, anderenfalls wird der Lauf vom **cobas z 480** Analyzer für ungültig erklärt.

**Hinweis:** Die Handschuhe nach Bedarf wechseln, um eine Kreuzkontamination der Proben und Verunreinigungen der Außenseite der PCR-Reaktionsröhrchen zu vermeiden.

4. Mit neuen Pipettenspitzen für jede verdünnte Proben-DNA 25 µl der ersten Proben-DNA in die Kavitäten **C01**, **C02** und **C03** der Mikrotiterplatte geben, dabei für die Zugabe der Proben-DNA in jede Kavität eine neue Spitze verwenden; die Flüssigkeit in jeder Kavität durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Dieses Verfahren für die verdünnte DNA jeder Probe wiederholen und gemäß der Vorlage in Tabelle 2 die DNA-Verdünnungen aller Proben auf die Mikrotiterplatte geben. Die gesamte Flüssigkeit muss sich unten in den Kavitäten sammeln.
5. Die Mikrotiterplatte mit Versiegelungsfolie (im Lieferumfang der Platten enthalten) abdecken. Das Versiegelungsfolienwerkzeug verwenden, damit die Versiegelungsfolie fest auf der Mikrotiterplatte haftet.
6. Vor Beginn der PCR sicherstellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit unten in den Kavitäten angesammelt hat.

**Hinweis:** Amplifikation und Detektion müssen innerhalb von 1 Stunde nach Zugabe der ersten Proben-DNA-Verdünnung zum Gebrauchs-MMX gestartet werden.

## Starten der PCR

Ausführliche Anweisungen zum PIK3CA-Arbeitsablauf sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen. Wenn das Popup-Fenster „Select Test“ angezeigt wird, Arbeitsablauf „PCR only“ auswählen, „PIK3CA P1“ prüfen und auf „OK“ klicken.

# Ergebnisse

## Interpretation der Ergebnisse

**Hinweis:** Die gesamte Lauf- und Probenvalidierung wird von der **cobas® 4800 software** durchgeführt.

**Hinweis:** Ein gültiger Lauf kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 4 dargestellt interpretiert.

**Tabelle 4: Interpretation der Ergebnisse des cobas PIK3CA-Tests**

| Testergebnis         | Mutationsergebnis                              | Interpretation  |
|----------------------|--|---|
| Mutation Detected    | R88Q   | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | N345K  | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | C420R  | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | E542K  | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | E545X (E545A, E545D*, E545G oder E545K)        | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | Q546X (Q546E, Q546K, Q546L oder Q546R)         | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | M1043I**                                       | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | H1047X (H1047L, H1047R oder H1047Y)            | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | G1049R   | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| Mutation Detected    | (Es können mehrere Mutationen vorhanden sein.) | Mutation in spezifischer PIK3CA-Zielregion detektiert   |
| No Mutation Detected | k. A.  | Keine Mutation in den PIK3CA-Zielregionen detektiert  |
| Invalid              | k. A.  | Probenergebnis ist ungültig. Proben mit einem ungültigen Ergebnis gemäß den Anweisungen unter „Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis“ neu testen. |
| Failed               | k. A.  | Lauf ist infolge eines Hardware- oder Software-Fehlers fehlgeschlagen. Den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung kontaktieren.              |

\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz E545D können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.1635G>T nachgewiesen werden.

\*\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz M1043I können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.3129G>T nachgewiesen werden.

**Hinweis:** Das Vorliegen einer Mutation in den PIK3CA-Zielregionen kann bei dem Ergebnis „No Mutation Detected“ nicht ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse von prozentualen Mutationssequenzen, einer angemessenen Probenintegrität, der Abwesenheit von Inhibitoren und einer für die Detektion ausreichenden Menge an DNA abhängen.

## Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis

1. Die Verdünnung der ungültigen DNA-Probenstammlösungen erneut vornehmen. Dabei mit den Anweisungen unter „Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung“ und „Probenverdünnung“ im Abschnitt **Amplifikation und Detektion** beginnen.
2. Nach der Verdünnung der DNA-Stammlösung auf 2 ng/µl gemäß den Anweisungen unter „Probenverdünnung“ mit den Anweisungen unter „Herstellung der Gebrauchs-MMX“ (MMX-1, MMX-2 und MMX-3) und dem übrigen Amplifikations- und Detektionsverfahren fortfahren.

**Hinweis:** Wenn die Probe auch nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist oder in Schritt A von Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis nicht genügend DNA-Stammlösung zur Herstellung einer anderen Verdünnung vorhanden war, muss das gesamte Testverfahren für diese Probe ab der Entparaffinierung und DNA-Isolierung unter Verwendung eines neuen 5-µm-FFPE-Tumor-Gewebeschnitts wiederholt werden.

## Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

In jedem Lauf des **cobas** PIK3CA-Tests mit bis zu 30 Proben wird ein Satz aus **PIK3CA MC** (Kavitäten **A01**, **A02** und **A03**) und **NEG** (Kavitäten **B01**, **B02** und **B03**) für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 mitgeführt. Ein Lauf ist gültig, wenn **PIK3CA MC** und **NEG** gültig sind. Wenn eine **PIK3CA MC** oder **NEG** ungültig ist, ist der gesamte Lauf ungültig und muss wiederholt werden. Eine frische Verdünnung der zuvor isolierten DNA-Probenstammlösung ansetzen, um für die Amplifikation und Detektion eine neue Mikrotiterplatte mit Kontrollen vorzubereiten.

### Mutationskontrolle

Das Ergebnis der **PIK3CA MC** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse für **PIK3CA MC** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

### Negativkontrolle

Das Ergebnis der **NEG** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse für **NEG** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

## Verfahrenseinschränkungen

1. Nur das angegebene Probenmaterial testen. Der **cobas** PIK3CA-Test wurde anhand von BC-FFPE-Proben überprüft.
2. Der **cobas** PIK3CA-Test wurde nur mit dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190) validiert.
3. Die Detektion einer Mutation hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Kopien ab und kann durch die Probenintegrität, die Menge der isolierten DNA und das Vorliegen von Störsubstanzen beeinflusst werden.
4. Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Fixierung, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die Vorgehensweisen in der Gebrauchsanweisung des **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), in dieser Gebrauchsanweisung sowie in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems sind zu befolgen.
5. Die Auswirkungen anderer potenzieller Variablen, wie z. B. Variablen der Probenfixierung, wurden nicht evaluiert.
6. Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum Master-Mix des **cobas** PIK3CA-Tests ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden.
7. Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
8. Für die Verwendung mit diesem Produkt wurde ausschließlich der **cobas z** 480 Analyzer überprüft. Es darf kein anderer Thermocycler mit optischer Echtzeit-Detektion mit diesem Produkt verwendet werden.

9. Bevor Benutzer von einer Methode zu einer anderen wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Korrelationsstudien durchführen, um die Unterschiede der Techniken aufzuzeigen.
10. Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
11. In seltenen Fällen können Mutationen in der genomischen DNA des PIK3CA-Gens, die durch die im **cobas** PIK3CA-Test verwendeten Primer oder Sonden abgedeckt sind, zu einem falschen Ergebnis führen.
12. In seltenen Fällen kann der **cobas** PIK3CA Test für Mutationen, die die Zielmutationen in den Exons 10 und 21 flankieren, eine beschränkte Kreuzreaktivität (Ergebnis „Mutation Detected“) zeigen. So kann E545K bei hohen Anteilen an Mutantensequenzen ein Mutationsergebnis von E545X;Q546X bzw. H1047X ein Mutationsergebnis von H1047X;G1049R liefern.
13. Der **cobas** PIK3CA-Test wurde für die Verwendung mit einer DNA-Menge von 50 ng pro Kavität validiert. Von DNA-Mengen unter 50 ng pro Kavität wird abgeraten.
14. Beim **cobas** PIK3CA-Test handelt es sich um einen qualitativen Test. Er dient nicht zur quantitativen Bestimmung des Mutationsgrades.
15. Enthalten BC-FFPE-Gewebeproben zersetzte DNA, so kann dies die Detektionsleistung des Tests in Bezug auf PIK3CA-Mutationen beeinträchtigen.
16. Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ erzielt wird, können PIK3CA-Mutationen enthalten, die mit dem Test nicht nachgewiesen werden.
17. In seltenen Fällen können Proben mit Doppelmutationen, die auf einem DNA-Strang nahe beieinander liegen, den Nachweis einer der beiden Mutationen stören (z. B. kann P539R (CCT>CGT) den Nachweis von E542K und Y343Y (TAC>TAT) den Nachweis von N345K stören).

## Nichtklinische Leistungsmerkmale

*Hinweis:* Die folgenden Studienbeschreibungen umfassen Daten, die mit dem **cobas** PIK3CA-Test erfasst wurden.

Der prozentuale Tumorgehalt wurde bei den nachfolgend beschriebenen nicht-klinischen Studien durch pathologische Untersuchungen bestimmt. Die Proben wurden mittels bidirektionaler Sanger-Sequenzierung und Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS, Next Generation Sequencing) für die Tests ausgewählt. Der Mutationsgrad der BC-FFPE-Gewebeproben wurde mittels NGS bestimmt.

## Wichtigste Leistungsmerkmale

### Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze (LoB)

Um die Leistung des **cobas** PIK3CA-Tests zu bewerten und sicherzustellen, dass Wildtyp (WT)-Proben kein analytisches Signal erzeugen, das auf eine niedrige Mutationskonzentration hindeuten könnte, wurden BC-FFPE-Proben mit PIK3CA-Wildtyp evaluiert. Die Leerwertgrenze wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A2<sup>18</sup> für PIK3CA-WT-Proben unter Verwendung der nichtparametrischen Option bestimmt. Die bestimmte Leerwertgrenze beträgt bei allen Mutationen 0.

## Nachweisgrenze bei FFPE-Gewebeprobenmischungen

Aus 33 BC-FFPE-Proben mit PIK3CA-Mutationen isolierte DNA-Extrakte wurden mit DNA-Extrakten gemischt, die aus 25 BC-FFPE-Proben mit PIK3CA-Wildtyp isoliert wurden, um 42 eindeutige DNA-Mischungen mit den Mutationsgraden 10,0 %, 7,5 %, 5,0 %, 2,5 % und 1,0 % zu erhalten. Der Mutationsgrad wurde dabei mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS) bestimmt. Von jeder Proben-DNA-Mischung wurden Verdünnungen hergestellt und insgesamt 21 Replikate jedes Mutationsgrads wurden mit drei cobas PIK3CA-Testkit-Chargen getestet (n = 21/Panelprobe). Die Nachweisgrenze jeder Probe wurde anhand des geringsten Mutationsgrads bestimmt, mit der eine „Mutation Detected“-Rate für PIK3CA von mindestens 95 % für die Zielmutation erhalten wurde (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Nachweisgrenze des cobas PIK3CA-Tests für FFPE-Proben-DNA-Mischungen**

| PIK3CA-Exon | PIK3CA-Mutation | PIK3CA-Nukleinsäuresequenz | COSMIC-ID <sup>12</sup> | Probe    | Mutationsgrad der Panelprobe zum Erreichen einer „Mutation Detected“-Ergebnisrate von ≥ 95 % mit einer DNA-Menge von 50 ng pro Kavität (N = 21 Replikate) |
|-------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|----------|---|
| 2           | R88Q            | 263 G>A                    | 746                     | Probe 1  | 2,2 %   |
| 2           | R88Q            | 263 G>A                    | 746                     | Probe 2  | 1,3 %   |
| 2           | R88Q            | 263 G>A                    | 746                     | Probe 3  | 1,1 %   |
| 5           | N345K           | 1035 T>A                   | 754                     | Probe 4  | 2,2 %   |
| 5           | N345K           | 1035 T>A                   | 754                     | Probe 5  | 1,9 %   |
| 5           | N345K           | 1035 T>A                   | 754                     | Probe 6  | 1,3 %   |
| 8           | C420R           | 1258 T>C                   | 757                     | Probe 7  | 1,7 %   |
| 8           | C420R           | 1258 T>C                   | 757                     | Probe 8  | 1,9 %   |
| 8           | C420R           | 1258 T>C                   | 757                     | Probe 9  | 1,6 %   |
| 10          | E542K           | 1624 G>A                   | 760                     | Probe 10 | 1,1 %   |
| 10          | E542K           | 1624 G>A                   | 760                     | Probe 11 | 1,2 %   |
| 10          | E542K           | 1624 G>A                   | 760                     | Probe 12 | 1,1 %   |
| 10          | E545A           | 1634 A>C                   | 12458                   | Probe 13 | 2,8 %   |
| 10          | E545A           | 1634 A>C                   | 12458                   | Probe 14 | 0,9 %   |
| 10          | E545A           | 1634 A>C                   | 12458                   | Probe 15 | 1,6 %   |
| 10          | E545G           | 1634 A>G                   | 764                     | Probe 16 | 1,8 %   |
| 10          | E545G           | 1634 A>G                   | 764                     | Probe 17 | 1,2 %   |
| 10          | E545G           | 1634 A>G                   | 764                     | Probe 18 | 1,6 %   |
| 10          | E545K           | 1633 G>A                   | 763                     | Probe 19 | 3,3 %   |
| 10          | E545K           | 1633 G>A                   | 763                     | Probe 20 | 1,5 %   |
| 10          | E545K           | 1633 G>A                   | 763                     | Probe 21 | 1,8 %   |
| 10          | Q546E           | 1636 C>G                   | 6147                    | Probe 22 | 3,5 %   |
| 10          | Q546E           | 1636 C>G                   | 6147                    | Probe 23 | 1,6 %   |
| 10          | Q546E           | 1636 C>G                   | 6147                    | Probe 24 | 2,5 %   |
| 10          | Q546K           | 1636 C>A                   | 766                     | Probe 25 | 3,4 %   |
| 10          | Q546K           | 1636 C>A                   | 766                     | Probe 26 | 2,3 %   |
| 10          | Q546K           | 1636 C>A                   | 766                     | Probe 27 | 2,7 %   |
| 10          | Q546R           | 1637 A>G                   | 12459                   | Probe 28 | 1,5 %   |
| 10          | Q546R           | 1637 A>G                   | 12459                   | Probe 29 | 3,2 %   |
| 10          | Q546R           | 1637 A>G                   | 12459                   | Probe 30 | 1,3 %   |
| 21          | H1047L          | 3140 A>T                   | 776                     | Probe 31 | 2,8 %   |
| 21          | H1047L          | 3140 A>T                   | 776                     | Probe 32 | 1,8 %   |
| 21          | H1047L          | 3140 A>T                   | 776                     | Probe 33 | 3,3 %   |
| 21          | H1047R          | 3140 A>G                   | 775                     | Probe 34 | 2,8 %   |
| 21          | H1047R          | 3140 A>G                   | 775                     | Probe 35 | 1,5 %   |
| 21          | H1047R          | 3140 A>G                   | 775                     | Probe 36 | 1,0 %   |
| 21          | H1047Y          | 3139 C>T                   | 774                     | Probe 37 | 3,5 %   |

| PIK3CA-Exon | PIK3CA-Mutation | PIK3CA-Nukleinsäuresequenz | COSMIC-ID <sup>12</sup> | Probe    | Mutationsgrad der Panelprobe zum Erreichen einer „Mutation Detected“-Ergebnisrate von $\geq 95\%$ mit einer DNA-Menge von 50 ng pro Kavität (N = 21 Replikate) |
|-------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|----------|--|
| 21          | H1047Y          | 3139 C>T                   | 774                     | Probe 38 | 2,2 %  |
| 21          | H1047Y          | 3139 C>T                   | 774                     | Probe 39 | 3,4 %  |
| 21          | G1049R          | 3145 G>C                   | 12597                   | Probe 40 | 1,0 %  |
| 21          | G1049R          | 3145 G>C                   | 12597                   | Probe 41 | 0,7 %  |
| 21          | G1049R          | 3145 G>C                   | 12597                   | Probe 42 | 1,0 %  |

Mit dem **cobas** PIK3CA-Test konnten die Zielmutationen des PIK3CA-Gens mit einem Mutationsgrad von 0,7 % bis 3,5 % und einer DNA-Menge von 50 ng/PCR nachgewiesen werden.

## Nachweis seltener Genotypen unter Verwendung von Plasmiden

Für die drei in Tabelle 6 aufgeführten PIK3CA-Mutationen wurde ein DNA-Plasmid-Konstrukt mit WT-DNA gemischt, um DNA-Proben mit geringem Mutationsgrad herzustellen. Insgesamt wurden pro Plasmidmischung mindestens 20 Replikate mit einer DNA-Menge von 50 ng mit mindestens einer **cobas** PIK3CA-Testkit-Charge getestet. Die obere binomische 95-%-Konfidenzgrenze für die Plasmidmischungen kann Tabelle 6 entnommen werden.

**Tabelle 6: Mutationen, die mit dem cobas PIK3CA-Test für Mutationsplasmid-DNA-Mischungen nachgewiesen wurden**

| PIK3CA-Exon | PIK3CA-Mutation | PIK3CA-Nukleinsäuresequenz | COSMIC-ID <sup>12</sup> | Tatsächlicher Mutationsgrad | Untere binomische 95-%-Konfidenzgrenze (N $\geq 20$ ) | Obere binomische 95-%-Konfidenzgrenze (N $\geq 20$ ) |
|-------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|---|--|
| 10          | E545D           | 1635 G>T                   | 765                     | 1,2 %                       | 62 %  | 97 %   |
| 10          | Q546L           | 1637 A>T                   | 25041                   | 2,1 %                       | 83 %  | 100 %  |
| 21          | M1043I          | 3129 G>T                   | 773                     | 2,6 %                       | 83 %  | 100 %  |

## Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des **cobas** PIK3CA-Tests wurde anhand von zehn FFPE-Proben bewertet, darunter zwei WT-Proben und acht mutierte Proben, die je eine E542K-, N345K-, E545K-, C420R-, G1049R-, Q546K-, R88Q- oder H1047R-Mutation aufwiesen. Diese Proben wurden über acht Tage mit zwei verschiedenen Reagenzchargen, zwei **cobas z 480** Analyzern und von zwei Anwendern in Doppelbestimmungen getestet. Für jede Probe wurden insgesamt 32 Replikate evaluiert. Die Testgenauigkeit des **cobas** PIK3CA-Tests betrug dabei 99,7 % (319/320).

## Korrelation mit der Referenzmethode

206 BC-FFPE-Gewebeproben wurden Vergleichstests mit jeder der zwei Chargen des **cobas** PIK3CA-Tests und mittels Sanger-Sequenzierung unterzogen, um die positive, die negative sowie die allgemeine prozentuale Übereinstimmung zwischen den Methoden zu bestimmen. Nicht übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem **cobas** PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung wurden mittels NGS getestet, um die Abweichungen aufzulösen.

## cobas PIK3CA-Test- und Sanger-Ergebnisse

Tabelle 7 zeigt eine Gegenüberstellung der 205 gültigen Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und des **cobas** PIK3CA-Tests.

**Tabelle 7: Analyse der Übereinstimmung zwischen dem cobas PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung**

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

Positive Übereinstimmung = 100 % (95-%-KI = 96,1 % bis 100 %)

Negative Übereinstimmung = 93,6 % (95-%-KI = 87,4 % bis 96,9 %)

Gesamtübereinstimmung = 96,6 % (95-%-KI = 93,1 % bis 98,3 %)

MD: Mutation Detected

NMD: No Mutation Detected

\* Fünf Proben für Charge 1 und drei Proben für Charge 2 hatten sowohl bei der Sanger-Sequenzierung als auch beim **cobas** PIK3CA-Test das Ergebnis „Mutation Detected“, allerdings wurde mit der Sanger-Sequenzierung in allen Fällen nur eine der beiden Mutationen erkannt (vgl. Tabelle 9).

Beim Vergleich zwischen dem **cobas** PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung wurden für jede Probe neun Zielsequenzen ausgewertet. Somit wurden für die 205 gültigen Proben insgesamt 1845 Mutationsergebnisse erzielt. In Tabelle 8 werden die einzelnen Mutationsergebnisse des **cobas** PIK3CA-Tests und der Sanger-Sequenzierung für Charge 1 verglichen.

**Tabelle 8: Vergleich der einzelnen Mutationsergebnisse des cobas® PIK3CA-Tests und der Sanger-Sequenzierung für Charge 1**

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

\* Die Ergebnisse für Charge 2 waren ähnlich wie die Ergebnisse für Charge 1, allerdings gab es bei Charge 2 zwei nicht übereinstimmende Ergebnisse weniger. Siehe Probe 8 und Probe 9 in Tabelle 9.

## Auflösung nicht übereinstimmender Ergebnisse mittels NGS-Sequenzierung

Zwischen dem **cobas** PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung gab es sieben nicht übereinstimmende Mutationsergebnisse. Bei fünf weiteren Proben stimmte je eine ermittelte Mutation überein, jedoch wurde mit dem **cobas** PIK3CA-Test in diesen Fällen je eine zusätzliche Mutation nachgewiesen. Diese zwölf Proben wurden mittels NGS analysiert (vgl. Tabelle 9). Basierend auf den Ergebnissen der NGS-Sequenzierung wurde eine erweiterte Übereinstimmungsanalyse durchgeführt. In dieser Analyse wurden Proben, deren Ergebnisse aus der NGS-Sequenzierung dem Ergebnis des **cobas** PIK3CA-Tests entsprachen, als übereinstimmend betrachtet.

**Tabelle 9: Auflösung nicht übereinstimmender Ergebnissen mittels NGS**

| Probe    | Sanger | cobas PIK3CA-Test, Charge 1 | Auflösung mittels NGS, Charge 1**                   | cobas PIK3CA-Test, Charge 2 | Auflösung mittels NGS, Charge 2** |
|----------|--------|-----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Probe 1  | NMD    | H1047X                      | H1047R (3,4 % Mutation)                             | H1047X                      | H1047R (2,5 % Mutation)           |
| Probe 2  | NMD    | E542K                       | E542K (4,8 % Mutation)                              | E542K                       | E542K (3,4 % Mutation)            |
| Probe 3  | NMD    | H1047X                      | H1047R (2,0 % Mutation)                             | H1047X                      | H1047R (2,8 % Mutation)           |
| Probe 4  | NMD    | E542K                       | E542K (10,1 % Mutation)                             | E542K                       | E542K (8,3 % Mutation)            |
| Probe 5  | NMD    | E545X                       | E545K (4,3 % Mutation)                              | E545X                       | E545K (2,2 % Mutation)            |
| Probe 6  | NMD    | H1047X                      | H1047R (5,1 % Mutation);<br>H1047Y (1,1 % Mutation) | H1047X                      | H1047R (4,1 % Mutation)           |
| Probe 7  | NMD    | E545X                       | E545K (17,2 % Mutation)                             | E545X                       | E545K (25,6 % Mutation)           |
| Probe 8* | H1047L | H1047X; Q546X               | Q546K (2,2 % Mutation)                              | H1047X                      | k. A.                             |
| Probe 9* | Q546R  | H1047X; Q546X               | H1047R (0,6 % Mutation);<br>H1047Y (0,4 % Mutation) | Q546X                       | k. A.                             |
| Probe 10 | C420R  | H1047X; C420R               | H1047R (0,9 % Mutation)                             | H1047X; C420R               | H1047R (1,1 % Mutation)           |
| Probe 11 | E545K  | H1047X; E545X               | H1047R (1,7 % Mutation)                             | H1047X; E545X               | H1047R (1,8 % Mutation)           |
| Probe 12 | Q546E  | H1047X; Q546X               | H1047R (6,7 % Mutation)                             | H1047X; Q546X               | H1047R (5,4 % Mutation)           |

\* Bei den Proben 8 und 9 stimmten die Ergebnisse zwischen Charge 1 und Charge 2 nicht überein. Da die Ergebnisse von Charge 2 der Sanger-Sequenzierung entsprachen, war keine Auflösung erforderlich.

\*\* Die NGS-Sequenzierung zur Auflösung wurde nur für das/die Exon(s) mit abweichenden Ergebnissen durchgeführt.

**Hinweis:** Mit dem **cobas** PIK3CA-Test wurden für die Proben 8–12 neben denselben PIK3CA-Mutationen, die auch mit der Sanger-Sequenzierung ermittelt wurden, zusätzliche Mutationen nachgewiesen, die mittels NGS bestätigt werden konnten.

Nachdem die nicht übereinstimmenden Ergebnisse zwischen dem **cobas** PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung mittels NGS geklärt waren, betrug die Gesamtübereinstimmung aller Zielmutationsklassen zwischen dem **cobas** PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung für jede Charge 100 % (vgl. Tabelle 10).

**Tabelle 10: Analyse der Übereinstimmung zwischen dem cobas PIK3CA-Test und der Sanger-Sequenzierung einschließlich Auflösung nicht übereinstimmender Ergebnisse mittels NGS (Sanger + NGS)**

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

Positive Übereinstimmung = 100 % (95-%-KI = 96,4 % bis 100 %)

Negative Übereinstimmung = 100 % (95-%-KI = 96,4 % bis 100 %)

Gesamtübereinstimmung = 100 % (95-%-KI = 98,2 % bis 100 %)

In Tabelle 11 werden die einzelnen Mutationsergebnisse des **cobas** PIK3CA-Tests und der Sanger-Sequenzierung einschließlich Auflösung nicht übereinstimmender Ergebnisse mittels NGS für Charge 1 verglichen.

**Tabelle 11: Vergleich der einzelnen Mutationsergebnisse des cobas PIK3CA-Tests und der Sanger-Sequenzierung einschließlich Auflösung nicht übereinstimmender Ergebnisse mittels NGS (Sanger + NGS)**

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

\* Die Ergebnisse für Charge 2 waren ähnlich wie die Ergebnisse für Charge 1, allerdings wurden mit dem cobas PIK3CA-Test sowie mittels Sanger und NGS zwei Mutationen weniger nachgewiesen. Siehe Probe 8 und Probe 9 in Tabelle 9. In Charge 2 gab es zwei zusätzliche „No Mutation Detected“-Ergebnisse, und dementsprechend eine Q546X-Mutation und eine H1047X-Mutation weniger.

## Kreuzreaktivität

Die folgenden, nicht aus der Zielregion stammenden Mutationen wurden anhand von Plasmiden auf Kreuzreaktivität getestet, und zwar mit einer Konzentration von etwa 50 % Plasmid in genomischer DNA: M1043I, M1043V, M1043T, G1049S, G1049A, E542V, E542Q, E545D, E545V, E545Q, Q546P, Q546H und das PIK3CA-Pseudogen. Bei diesen nicht aus der Zielregion stammenden Mutationen wurde nach Zugabe in Proben mit Wildtyp- und mutierten PIK3CA-Sequenzen keine Kreuzreaktivität oder Interferenz mit dem **cobas** PIK3CA-Test festgestellt.

## Evaluierung potenzieller Störsubstanzen

### Endogen

Triglyceride ( $\leq 37$  mM, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI<sup>19</sup>) und Hämoglobin ( $\leq 2$  mg/ml, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI<sup>19</sup>) führten bei einer Zugabe der Substanz während der Probenvorbereitung nicht zu einer Störung des **cobas** PIK3CA-Tests. Außerdem waren bei Proben mit einem Fettgewebeanteil von bis zu 90 % ebenfalls keine Störeinflüsse auf den **cobas** PIK3CA-Test zu beobachten.

### Exogen

Die folgenden Arzneistoffe wurden bei 3facher  $C_{\max}$ -Konzentration auf Interferenz getestet: Letrozol, Anastrozol, Capecitabin, Tamoxifen, Exemestan, Everolimus, Paclitaxel, Docetaxel, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Fulvestrant. Es wurde gezeigt, dass diese Arzneistoffe bei Zugabe zu den Proben während der Probenvorbereitung den **cobas** PIK3CA-Test nicht störten.

### Nekrotisches Gewebe

BC-FFPE-Gewebeproben mit einem Gehalt von nekrotischem Gewebe von bis zu 55 % für PIK3CA-Mutationen und von bis zu 70 % bei WT-Proben führten bei der Bestimmung des Mutationsstatus mit dem **cobas** PIK3CA-Test zu keiner Störung.

# Klinische Leistungsmerkmale

## Klinische Studie zur Reproduzierbarkeit

Es wurde eine Studie zur Reproduzierbarkeit des cobas PIK3CA-Tests durchgeführt. Dazu wurde ein aus 21 Proben bestehendes DNA-Probenpanel aus FFPE-Gewebeschnitten vom Mammakarzinom-Wildtyp (WT) und von mutierten Tumorproben aus kommerziellen Gewebedatenbanken an 3 Testzentren (1 intern und 2 extern, 2 Anwender pro Zentrum) mit 3 Reagenzchargen an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Dieses Panel enthielt Mutationen der Exons 2, 5, 8, 10 und 21, die mittels DNA-Sequenzierung bestätigt wurden. Mit den 21 Panelproben wurden in 90 gültigen Läufen insgesamt 3.780 Tests durchgeführt; alle Testergebnisse waren gültig. In 180 gültigen Tests der WT-Panelproben wurden keine Mutationen erkannt, was einer Übereinstimmung von 100 % entspricht. Für 19 der 20 MT-Panelproben betrug die Übereinstimmung 100 %. Für die LoD-Panelprobe mit Exon 10 E545 betrug die Übereinstimmung 99,4 % (179 der 180 Testergebnisse lauteten „No Mutation Detected“). Die Ergebnisse der Gesamtübereinstimmung sind in Tabelle 12 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) lag bei allen Mutationspanelproben bei < 2 %. Der VK für die interne Kontrolle lag bei < 1,9 %. Der VK zwischen den Chargen lag bei < 0,4 % und der VK innerhalb einer Charge bei < 1,9 %.

**Tabelle 12: Werte der Gesamtübereinstimmung nach Panelprobe in der Studie zur Reproduzierbarkeit**

| Panelprobe               | Anzahl gültiger Tests | Übereinstimmung<br>N | Übereinstimmung in %<br>(95 % KI) <sup>a</sup> |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|--|
| Wildtyp                  | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 5 N345K – LoD       | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E542K – LoD      | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E545K – LoD      | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 H1047L – LoD     | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 G1049R – LoD     | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 5 N345K – 2 × LoD   | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E542K – 2 × LoD  | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E545K – 2 × LoD  | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 H1047L – 2 × LoD | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 G1049R – 2 × LoD | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 2 R88Q – LoD        | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 8 C420R – LoD       | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E545A – LoD      | 180                   | 179                  | 99,4 (96,9; 100,0)                             |
| Exon 10 Q546K – LoD      | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 H1047R – LoD     | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 2 R88Q – 2 × LoD    | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 8 C420R – 2 × LoD   | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 E545A – 2 × LoD  | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 10 Q546K – 2 × LoD  | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |
| Exon 21 H1047R – 2 × LoD | 180                   | 180                  | 100 (98,0; 100,0)                              |

**Hinweis:** Die Ergebnisse wurden als Übereinstimmung gewertet, wenn bei einem gültigen Test der Panelprobe einer Mutation das Ergebnis „Mutation Detected“ erzielt wurde oder wenn bei einem gültigen Test einer Wildtyp-Panelprobe das Ergebnis „No Mutation Detected“ erzielt wurde.

<sup>a</sup> 95-%-KI = exaktes Konfidenzintervall von 95 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reproduzierbarkeit des **cobas** PIK3CA-Tests zum Nachweis von Mutationen in den Exons 2, 5, 8, 10 und 21 des PIK3CA-Gens in DNA aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem menschlichen Mammakarzinomgewebe ausgezeichnet war und die Übereinstimmung für alle in dieser Studie untersuchten Mutationen > 99 % betrug.

## Ergebnis-Flags

### Bedeutung der Ergebnis-Flags

Die Herkunft eines Flags wird im Flag-Code angegeben (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13: Flag-Herkunft**

| Flag-Code beginnt mit | Flag-Herkunft              | Beispiel |
|-----------------------|----------------------------|----------|
| M*                    | Mehrere oder andere Gründe | M6       |
| R                     | Ergebnisinterpretation     | R500     |
| Z*                    | Analyzer                   | Z1       |

\* Siehe Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems.

Eine Zusammenfassung aller für den Benutzer relevanten Ergebnis-Flags des Systems finden Sie in Tabelle 14.

**Tabelle 14: Liste der Flags für die Ergebnisinterpretation**

| Flag-Code | Beschreibung  | Empfohlene Maßnahme   |
|-----------|---|---|
| R500–R511 | Mutationskontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.            | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat. Dies ist u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen.   |
| R512–R523 | Mutationskontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.            | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Mutationskontrolle ein negatives Ergebnis ausgegeben wurde (d. h. die Mutationskontroll-DNA wurde u. U. in eine oder mehrere Kavitäten nicht hinzugegeben).  |
| R524–R535 | Die Mutationskontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs. | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass ein für die Mutationskontrolle gemessener Elbow-Wert unter dem festgelegten Schwellenwert lag (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dieser Fehler kann bei einer DNA-Kontamination auftreten.   |
| R536–R547 | Die Mutationskontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs. | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass ein für die Mutationskontrolle gemessener Elbow-Wert über dem festgelegten Schwellenwert lag (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Dieser Fehler kann in den folgenden Fällen auftreten: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Falsche Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix</li> <li>2. Pipettierfehler bei der Zugabe von Gebrauchs-Master-Mix in eine Kavität der Mikrotiterplatte</li> <li>3. Pipettierfehler bei der Zugabe von Mutationskontrolle in eine Kavität der Mikrotiterplatte</li> </ol> |

| Flag-Code   | Beschreibung  | Empfohlene Maßnahme  |
|---|---|--|
| R548–R559   | Die Negativkontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.        | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat. Dies ist u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen.  |
| R560–R571   | Die Negativkontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs. | Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Negativkontrolle ein positives Ergebnis angegeben wurde (d. h. es ist eine Kontamination aufgetreten).  |
| R572–R583   | Es konnte keine Zielsequenz nachgewiesen werden.              | Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat. Dies ist u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen.   |
| R584–R586,<br>R588–R590,<br>R592–R594,<br>R596–R604 | Das Ergebnis liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.         | Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben eines der folgenden Probleme an:<br><ol style="list-style-type: none"> <li>1. Für die Probe wurde ein ungewöhnlich niedriger Elbow-Wert gemessen.</li> <li>2. Für die Probe wurde ein auffälliges Verhältnis zwischen dem Elbow-Wert für die Mutation und dem Elbow-Wert für die interne Kontrolle festgestellt.</li> </ol>   |
| R587, R591,<br>R595                                 | Interne Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs           | Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Probe ein ungewöhnlich niedriger Elbow-Wert für die interne Kontrolle gemessen wurde. Dieser Fehler kann auftreten, wenn das PCR-Gemisch signifikant zu viel konzentrierte genomische DNA enthält.   |
| R605–R610   | Die interne Kontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.       | Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt <b>Testverfahren</b> . Diese Flag-Codes geben an, dass das Ergebnis der internen Kontrolle für die Probe ungültig war. Wenn kein gültiges Ergebnis für die interne Kontrolle vorliegt, kann dies folgende Ursachen haben:<br><ol style="list-style-type: none"> <li>1. Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe</li> <li>2. Unzureichende Probenverarbeitung</li> <li>3. PCR-Inhibitoren in der Probe</li> <li>4. Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Sonden der internen Kontrolle abgedeckt sind</li> <li>5. In mindestens eine Kavität wurde keine Proben-DNA gegeben</li> <li>6. Andere Faktoren</li> </ol> |

## Weitere Informationen

### Wichtigste Leistungsmerkmale des Assays

|   |   |
|---|---|
| <b>Probenmaterial</b>                   | Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes (FFPE-)Gewebe |
| <b>Erforderliche Probenmindestmenge</b> | 5-µm-FFPE-Gewebeschnitt                                     |
| <b>Analytische Sensitivität</b>         | 5 % Mutantensequenzen in 50 ng DNA                          |
| <b>Analytische Spezifität</b>           | 100%ige Übereinstimmung mit Sequenzierung                   |
|   | R88Q  |
|   | N345K   |
|   | C420R   |
|   | E542K   |
| <b>Nachweisbare Genotypen</b>           | E545X (E545A, E545D*, E545G oder E545K)                     |
|   | Q546X (Q546E, Q546K, Q546L oder Q546R)                      |
|   | M1043I**  |
|   | H1047X (H1047L, H1047R oder H1047Y)                         |
|   | G1049R  |

\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz E545D können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.1635G>T nachgewiesen werden.

\*\* Bei einer Veränderung der Aminosäuresequenz M1043I können mit dem Test nur Nukleotidveränderungen des Mutationstyps c.3129G>T nachgewiesen werden.

## Symbole

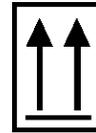
Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

**Tabelle 15: Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten**

|   |   |   |                                      |
|---|---|---|--------------------------------------|
|    | Alter oder Geburtsdatum                           |     | Herstellungsdatum                    |
|    | Zusatz-Software                                   |     | Vertrieb                             |
|     | Sollbereich (Kopien/ml)                           |     | Nicht wiederverwenden                |
|    | Sollbereich (IE/ml)                               |    | Frauen, weiblich                     |
|    | Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft |    | Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung |
|    | Barcode-Datenblatt                                |     | Globale Artikelnummer GTIN           |
|  | Chargenbezeichnung                                |   | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum        |
|  | Biogefährdung                                     |   | Unterer Grenzwert des Sollbereichs   |
|  | Bestellnummer                                     |  | Männer, männlich                     |
|  | Entnahmedatum                                     |   | Hersteller                           |
|  | Gebrauchsanweisung beachten                       |   | Negativkontrolle                     |
|  | Ausreichend für $\langle n \rangle$ Tests         |   | Nicht steril                         |
|  | Inhalt der Packung                                |   | Patienten-ID                         |
|  | Kontrolle   |   | Patientenname                        |



Hier abziehen



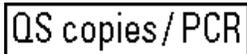
Diese Seite oben



Positivkontrolle



Eindeutige Geräteerkennung



Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion



Ultrasensitives Verfahren



Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion



Oberer Grenzwert des Sollbereichs



Seriennummer



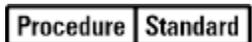
Fülllinie für Urin



Zentrum, Labor

Rx Only

Nur für die USA: In den USA darf dieser Test nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.



Standardverfahren



Verwendbar bis



Mit Ethylenoxid sterilisiert



Gerät für eine patientennahe Testung



Im Dunkeln aufbewahren



Gerät nicht für eine patientennahe Testung geeignet



Temperaturbegrenzung



Gerät für Selbsttests



Testdefinitionsdatei



Gerät nicht für Selbsttests geeignet

CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für *In-vitro*-Diagnostika.

## Technischer Support

Technischen Support erhalten Sie bei Ihrer Niederlassung vor Ort:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Herstellung und Vertrieb

**Tabelle 16: Herstellung und Vertrieb**



Hergestellt in den USA

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

## Marken und Patente

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

## Copyright

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



## Literatur

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

## Dokumentversion

| <b>Dokumentversionsübersicht</b> |                       |
|----------------------------------|-----------------------|
| Doc Rev. 1.0<br>09/2020          | Erstveröffentlichung. |