

Para informações de preparação de amostras, consulte o **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

UTILIZAÇÃO PREVISTA

A principal utilização do **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test é a detecção das mutações V600 do BRAF em ADN extraído de tecido de carcinoma papilífero da tiroide (CPT) e de melanoma humano fixado em formalina e conservado em parafina. Em melanoma, destina-se a ser utilizado como auxiliar na seleção de pacientes cujos tumores têm mutações V600 do BRAF, para tratamento exclusivamente com ZELBORAF[®] (vemurafenib), ou com COTELLIC[®] (cobimetinib) em combinação com ZELBORAF[®] (vemurafenib).

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Ocorrem mutações ativadoras do proto-oncogene BRAF em muitos cancros humanos, incluindo o melanoma maligno, cancro colorretal, cancro do ovário e cancro da tiroide.^{1, 2} Foram identificadas mutações BRAF em 40% a 60% dos melanomas malignos³ e em 36 a 46% dos carcinomas papilíferos da tiroide.^{4, 5} As mutações BRAF também são vulgares em nevos benignos,⁶ indicando que tais mutações são um evento muito precoce. A descoberta destas mutações somáticas do gene BRAF no melanoma, no CPT e em outros tumores humanos ajudou a elucidar o papel central da quinase BRAF nas vias de sinalização que controlam a proliferação celular, a diferenciação e a morte celular. Em células normais, o gene BRAF faz parte de uma via de sinalização altamente regulada que medeia os efeitos de recetores de fatores de crescimento (tais como o EGFR) através de RAS, RAF, MEK e ERK. As mutações oncogénicas no BRAF resultam num ganho da função de quinase, tornando a via RAF-MEK-ERK constitutivamente ativa na ausência de fatores de crescimento típicos.

A maioria das mutações BRAF no melanoma, no CPT e noutros tumores humanos ocorrem no códon 600.⁷ A mutação predominante no códon 600 é a mutação V600E (GTG > GAG). Um número de mutações de dinucleótidos que afetam o códon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) e V600D (GTG > GAT)] também têm sido observadas menos frequentemente, principalmente no melanoma e raramente noutros tumores, como o cancro colorretal.

O **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test é um ensaio de PCR em tempo real concebido para detetar a presença da mutação V600E (T1799A). O **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test é utilizado como teste de diagnóstico complementar do vemurafenib, um composto que inibe a mutação V600E do BRAF. Ensaio clínicos do vemurafenib em pacientes com melanoma avançado demonstraram que pacientes com tumores com a mutação V600E são suscetíveis de obter benefícios clínicos do composto.^{8, 9} Posteriormente, um ensaio clínico do cobimetinib em combinação com vemurafenib em pacientes com melanoma avançado demonstrou que pacientes com tumores com mutação V600E ou V600K detetados pelo **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test são suscetíveis de obter benefícios clínicos desta terapêutica.^{10, 11} A mutação V600K está presente em aproximadamente 10 a 15% das amostras de melanoma com mutações V600 do BRAF.¹²

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test (teste **cobas** BRAF) baseia-se em dois processos: (1) preparação manual de amostras para obter ADN genómico a partir de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPET); (2) amplificação por PCR e detecção do ADN alvo utilizando um par de primers complementares e duas sondas oligonucleotídicas marcadas com corantes fluorescentes diferentes. Uma sonda foi concebida para detetar a sequência V600 do wild-type BRAF e a outra foi concebida para detetar a sequência da mutação V600E. São fornecidos dois controlos externos da corrida e o alelo wild-type é utilizado como um controlo interno total do processo.

Preparação de amostras

As amostras de FFPET são processadas e o ADN genómico é isolado utilizando o **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit, uma preparação manual de amostras com base na ligação dos ácidos nucleicos a fibras de vidro. Uma secção desparafinada de 5 µm de uma amostra de FFPET é lisada por incubação a uma temperatura elevada com uma protease e tampão caotrópico de lise/ligação que liberta ácidos nucleicos e protege o ADN genómico libertado das DNases. Subsequentemente, é adicionado isopropanol à mistura de lise que, em seguida, é centrifugada através de uma coluna com um acessório de filtragem de fibra de vidro. Durante a centrifugação, o ADN genómico liga-se à superfície do filtro de fibra de vidro. As substâncias não ligadas, tais como sais, proteínas e outras impurezas celulares, são removidas por centrifugação. Os ácidos nucleicos adsorvidos são lavados e depois eluídos com uma solução aquosa. A quantidade de ADN genómico é determinada espectrofotometricamente e ajustada para uma concentração fixa para ser adicionada à mistura de amplificação e detecção. O ADN alvo é então amplificado e detetado no **cobas z** 480 analyzer utilizando os reagentes de amplificação e detecção fornecidos no kit do teste **cobas** BRAF.

Amplificação por PCR e detecção

Seleção do alvo

O teste **cobas** BRAF utiliza primers que definem uma sequência de 116 pares de bases de ADN genómico humano contendo a região do códon 600 do BRAF no exão 15. O gene BRAF não é amplificado na totalidade. O teste **cobas** BRAF foi concebido para detetar a alteração do nucleotídeo 1799 T > A no gene BRAF que resulta numa substituição do ácido glutâmico pela valina no códon 600 (V600E). Sondas TaqMan de BRAF wild-type e ADN mutante específicas do alvo e marcadas com corante fluorescente ligam-se às sequências wild-type e mutante, respetivamente. As sequências wild-type e mutante são detetadas utilizando um canal ótico específico para cada sequência.

Amplificação do Alvo

A polimerase do ADN Z05 da Thermus species é utilizada para amplificação do alvo. Primeiro, a mistura de reação da PCR é aquecida para desnaturar o ADN genómico e expor as sequências alvo do iniciador. À medida que a mistura arrefece, os primers a jusante e a montante ligam-se às sequências do ADN alvo. A polimerase do ADN Z05, na presença de iões metálicos bivalentes e dNTPs em excesso, alonga cada iniciador ligado, ocorrendo assim a síntese de uma segunda cadeia de ADN. Isto completa o primeiro ciclo de PCR, dando origem a uma cópia de ADN de dupla cadeia da região alvo de 116 pares de base do gene BRAF. Este processo é repetido durante um determinado número de ciclos, com cada ciclo a duplicar eficazmente a quantidade de ADN amplicon. A amplificação ocorre apenas na região do gene BRAF entre os iniciadores.

Deteção automática em tempo real

O teste **cobas** BRAF utiliza tecnologia de PCR em tempo real. Cada sonda oligonucleotídica específica para o alvo da reação está marcada com um corante fluorescente, que atua como um sinalizador, e com uma molécula supressora que absorve (extingue) as emissões fluorescentes do corante sinalizador de uma sonda intacta. Durante cada ciclo de amplificação, as sondas que são complementares da sequência de ADN de cadeia simples no amplicon ligam-se e subsequentemente são clivadas pela atividade da nuclease 5' a 3' da polimerase do ADN Z05. Assim que o corante sinalizador é separado do supressor por esta atividade da nuclease, a fluorescência de um comprimento de onda característico pode ser medida quando o corante sinalizador é excitado pelo espectro de luz adequado. São utilizados dois corantes sinalizadores diferentes para marcar a sonda específica do alvo wild-type BRAF (WT) e a sonda da mutação BRAF V600E. A amplificação de cada uma das duas sequências de BRAF pode ser detetada independentemente, num único poço de reação, medindo a fluorescência em canais óticos dedicados que emitem em dois comprimentos de onda característicos.

Amplificação seletiva

No teste **cobas** BRAF, a amplificação seletiva do ácido nucleico alvo a partir da amostra é conseguida com a utilização da enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e do trifosfato de desoxiuridina (dUTP).¹³ A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN que contêm desoxiuridina, mas não de ADN que contêm timidina. A desoxiuridina não se encontra em ADN existente na natureza, mas está sempre presente no amplicon, devido à utilização do dUTP como um dos trifosfatos nucleotídicos no reagente da Mistura de Reação; por conseguinte, apenas o amplicon contém desoxiuridina. A desoxiuridina torna o amplicon contaminante suscetível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do ADN alvo. A enzima AmpErase, que está incluída no reagente da Mistura de Reação, catalisa a clivagem de ADN contendo desoxiuridina nos resíduos de desoxiuridina, abrindo a cadeia de desoxirribose na posição C1. Quando aquecida no primeiro passo da reação de PCR, em pH alcalino, a cadeia de ADN do amplicon quebra-se na posição da desoxiuridina, tornando assim o ADN não amplificável. A enzima AmpErase é inativa a temperaturas acima dos 55 °C, ou seja, durante os passos de aquecimento, pelo que não destrói o amplicon alvo.

REAGENTES

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 testes (M/N: 05985595190)			
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança^a
RXNMIX (Mistura de reação)	Tampão de tricina Acetato de potássio Hidróxido de potássio Glicerol Tween 20 EDTA 5% de sulfóxido de dimetilo < 0,09% dNTPs < 0,10% de polimerase do ADN Z05 (de origem microbiana) < 0,10% de enzima de AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana) < 0,003% de aptâmero oligonucleotídico 0,08% de azida sódica	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (Acetato de magnésio)	Acetato de magnésio 0,09% de azida sódica	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (Mistura Oligo BRAF)	Tampão Tris-HCl EDTA 0,09% de azida sódica ARN de Poli rA (sintético) < 0,01% de primers do BRAF a jusante e a montante < 0,01% de sondas de BRAF de marcação fluorescente	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (Controlo Mutante de BRAF)	Tampão Tris-HCl EDTA ARN de Poli rA (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,001% de ADN de plasmídeo (de origem microbiana) contendo sequência de mutante de BRAF < 0,001% de ADN de plasmídeo (de origem microbiana) contendo sequência de wild-type BRAF	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (Controlo Wild-type BRAF)	Tampão Tris-HCl EDTA ARN de Poli rA (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,001% de ADN de plasmídeo (de origem microbiana) contendo sequência de wild-type BRAF	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (Diluyente de Amostras de ADN)	Tampão Tris-HCl 0,09% de azida sódica	2 × 1 ml	N/A

^a A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

A. PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

- B. Este teste destina-se a ser utilizado com amostras de tecido fixado em formalina e conservado em parafina.
- C. Não efetue pipetagem com a boca.
- D. Não comer, beber ou fumar em áreas de trabalho laboratorial.
- E. Evitar a contaminação microbiana e contaminação dos reagentes, por DNA.
- F. Eliminar os reagentes não utilizados e os resíduos em conformidade com a legislação local.
- G. Não utilizar kits fora dos prazos de validade.
- H. Não agrupar reagentes de lotes ou kits diferentes.
- I. Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, *Safety Data Sheets*) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- J. Para evitar contaminação, devem ser usadas luvas que devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e de reagentes do **cobas**[®] 4800.
- K. Para evitar a contaminação da mistura principal de trabalho com amostras de ADN, a amplificação e deteção deverá ser efetuada numa área separada do Isolamento do ADN. A área de trabalho da amplificação e deteção deverá ser limpa a fundo antes da preparação da mistura principal de trabalho. Para uma limpeza adequada, todas as superfícies, incluindo racks e pipetas, deverão ser cuidadosamente limpas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%*, limpando a seguir com uma solução de etanol a 70%.

*** NOTA: a lixívia líquida doméstica contém habitualmente hipoclorito de sódio a uma concentração de 5,25%. Uma diluição de lixívia doméstica de 1:10 irá dar origem a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.**

- L. As amostras deverão ser manuseadas como se fossem infecciosas, utilizando procedimentos de laboratório seguros, conforme os descritos em *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ e no Documento M29-A4 do CLSI.¹⁵
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT e DNA SD** contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e de cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar soluções contendo azida sódica nos lavatórios do laboratório, verta nos canos com um grande volume de água fria para impedir a acumulação de azidas.
- N. Ao manusear quaisquer reagentes, use sempre proteção para os olhos, bata de laboratório e luvas descartáveis. Evite o contacto destes materiais com a pele, olhos ou membranas mucosas. Se ocorrer contacto, lave imediatamente com água em abundância. Caso não seja efetuado tratamento, podem surgir queimaduras. Se ocorrer derrame, dilua com água antes de secar.
- O. Todos os itens descartáveis são de utilização única. Não reutilizar.
- P. Não utilizar produtos descartáveis que tiverem ultrapassado o respetivo prazo de validade.
- Q. Não utilizar solução de hipoclorito de sódio (lixívia) para limpar o **cobas z** 480 analyzer. Limpe o **cobas z** 480 analyzer de acordo com os procedimentos descritos no Manual do operador apropriado do **cobas**[®] 4800 System ou na Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System.
- R. Para outras advertências, precauções e procedimentos para reduzir o risco de contaminação do **cobas z** 480 analyzer, consulte o Manual do operador do **cobas**[®] 4800 System ou a Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System.
- S. Recomenda-se a utilização de pipetas esterilizadas e de pontas de pipeta isentas de DNase e descartáveis.

REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANUSEAMENTO

- A. Não congelar os reagentes.
- B. Conservar os **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT e DNA SD** entre 2 e 8 °C. Uma vez abertos, estes reagentes mantêm-se estáveis para até 4 utilizações durante 60 dias ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar.
- C. O **BRAF OM** e a Mistura Principal de Trabalho (preparada por adição de **BRAF OM** e **MGAC** à **RXNMIX**) deverão estar protegidos de exposição prolongada à luz.
- D. A Mistura Principal de Trabalho (preparada por adição de **BRAF OM** e **MGAC** à **RXNMIX**) deve ser conservada entre 2 e 8 °C num local escuro. As amostras e os controlos preparados têm de ser adicionados no prazo de 1 hora após a preparação da Mistura Principal de Trabalho.
- E. Amostras processadas (ADN extraído) mantêm-se estáveis durante até 24 horas, entre 15 °C e 30 °C, ou até 14 dias, entre 2 °C e 8 °C ou até 60 dias, entre -15 °C e -25 °C, ou após 3 ciclos de congelação/descongelação, quando armazenadas entre -15 °C e -25 °C. O ADN extraído deve ser amplificado dentro dos períodos de armazenamento recomendados ou antes do fim do prazo de validade do **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit utilizado para extrair o ADN, o que primeiro se verificar.
- F. A amplificação tem de ter início no prazo de 1 hora após a adição das amostras e controlos processados à Mistura Principal de Trabalho (preparada por adição de **BRAF OM** e **MGAC** à **RXNMIX**).

MATERIAIS FORNECIDOS

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

BRAF

24 testes

RXNMIX

(Mistura de Reação) (Tampa com cor esbranquiçada)

MGAC

(Acetato de magnésio) (Tampa com cor amarela)

BRAF OM

(Mistura Oligo BRAF) (Tampa preta com cor branca)

BRAF MUT

(Controlo Mutante de BRAF) (Tampa com cor vermelha)

BRAF WT

(Controlo Wild-type BRAF) (Tampa com cor azul)

DNA SD

(Diluyente de Amostras de ADN) (Tampa com cor púrpura)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
- Microplaca (placa AD) e a Película Vedante (Roche M/N: 05232724001) do **cobas[®]** 4800 System
- Pipetas reguláveis*: (capacidade de 10 µl, 20 µl, 200 µl e 1000 µl) com pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo, isentas de RNase
- Tubos de microcentrífuga com fixação de tampa (1,5 ml, esterilizados, isentos de RNase/DNase, de tipo PCR) (qualquer fornecedor)
- Espectrofotómetro para medição da concentração de ADN**
- Misturador de agitação forte**
- Racks para tubos de microcentrífuga
- Luvas de laboratório, sem pó
- Congelador capacitado para armazenamento a temperaturas entre -25 °C e -15 °C

* *As pipetas devem ser mantidas de acordo com as instruções do fabricante e a precisão deve situar-se dentro de 3% do volume declarado. Devem ser usadas pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo e isentas de DNase sempre que tal for especificado, para impedir a degradação e a contaminação cruzada da amostra.*

** *Todos os equipamentos devem ser mantidos adequadamente, de acordo com as instruções do fabricante.*

Equipamentos e Software

- **cobas z** 480 analyzer
- Unidade de controlo do **cobas[®]** 4800 SR2 System com imagem do Windows XP
- **cobas[®]** 4800 SR2 System Software, versão 2.0 ou superior
- Software do Pacote de Análise BRAF, versão 1.0 ou superior
- Leitor de códigos de barras (Roche M/N: 05339910001)
- Impressora HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

NOTA: *manuseie todas as amostras tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.*

A. Colheita da amostra

Foram validadas as amostras de FFPET para utilização com o teste **cobas** BRAF.

B. Transporte da amostra

As amostras de FFPET podem ser transportadas a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. O transporte de amostras de FFPET deve obedecer à legislação local, estadual, federal e do país relativa ao transporte de agentes etiológicos.¹⁶

C. Armazenamento de amostras

Foi confirmada a estabilidade das amostras de FFPET conservadas entre 15 e 30 °C durante um máximo de 12 meses após a data da colheita. Secções de FFPET de 5 µm montadas em lâminas podem ser conservadas entre 15-30 °C durante um máximo de 60 dias.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

NOTA: todos os reagentes excepto a RXNMIX, o MGAC e o BRAF OM, devem estar à temperatura ambiente antes de serem usados. Os RXN MIX, MGAC e BRAF OM podem ser retirados diretamente do armazenamento entre 2 e 8 °C para preparar a Mistura Principal de Trabalho.

NOTA: apenas secções de FFPET de melanoma e de CPT de 5 µm de espessura que contenham pelo menos 50% de células tumorais devem ser usadas no teste cobas BRAF. Quaisquer amostras que contenham menos de 50% de células tumorais devem ser macro dissecadas depois da desparafinação.

NOTA: para instruções de operação detalhadas do cobas z 480 analyzer, consulte o Manual do operador do cobas® 4800 System ou a Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System.

Tamanho da corrida

O kit do teste cobas BRAF foi concebido para corridas de um mínimo de 3 amostras mais controlos até um máximo de 24 amostras mais controlos. Menos de 3 amostras mais controlos podem ser executadas de cada vez, mas podem originar volume insuficiente de reagentes para executar um total de 24 amostras mais controlos com o kit. O teste cobas BRAF contém reagentes suficientes para 8 corridas de 3 amostras mais controlos. Uma réplica do controlo mutante do cobas BRAF Test Mutant Control [BRAFMUT] e uma réplica do controlo wild-type do cobas BRAF Test Wild-Type Control [BRAFWT] são necessárias para executar cada corrida (consulte a secção "Controlo de qualidade").

Fluxo de trabalho

NOTA: o teste cobas BRAF pode ser utilizado para até 24 amostras numa corrida.

NOTA: para maximizar a utilização de reagentes, uma corrida de teste deverá incluir um mínimo de três (3) amostras mais controlos.

Isolamento do ADN

O ADN é isolado das amostras FFPET utilizando o cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Macrodissecação

Se a amostra contiver menos de 50% de conteúdo tumoral por área, a amostra deve ser macro dissecada como parte da preparação de amostra.

Quantificação do ADN

NOTA: a medição da concentração de ADN deverá ser efetuada imediatamente após o procedimento "Isolamento do ADN" e antes do armazenamento.

- A. Misture com agitação forte cada stock de ADN durante 5 segundos antes da quantificação.
- B. Quantifique o ADN utilizando um espectrofotómetro de acordo com o protocolo do fabricante. Utilize o DNA EB fornecido no cobas® DNA Sample Preparation Kit como o branco do equipamento. Em média, são necessárias 2 leituras consistentes. As duas medições deverão estar a $\pm 10\%$ uma da outra quando as leituras de concentração de ADN forem $\geq 20,0$ ng/µl. Para leituras de concentração de ADN $< 20,0$ ng/µl, as duas medições deverão estar dentro de $\pm 2,0$ ng/µl.
- C. A concentração do stock de ADN deve ser ≥ 5 ng/µl para efetuar o teste cobas BRAF.

NOTA: cada amostra de ADN deve ter uma concentração mínima de 5 ng/µl para executar o teste cobas BRAF. Se a concentração de um stock de ADN for < 5 ng/µl, repita os procedimentos de desparafinação, de isolamento do ADN e de quantificação do ADN para essa amostra, utilizando duas secções de FFPET de 5 µm. Para amostras montadas, depois da desparafinação, combine o tecido de ambas as secções num tubo, mergulhe o tecido em TLB e PK do cobas® DNA Sample Preparation Kit e efetue o isolamento e a quantificação do ADN. Para amostras não montadas, combine o tecido de ambas as secções num tubo e efetue a desparafinação e o isolamento e quantificação do ADN. Se a concentração do stock de ADN ainda for < 5 ng/µl, solicite outra secção de amostra de FFPET ao local de onde o doente veio referenciado.

NOTA: amostras processadas (ADN extraído) mantêm-se estáveis durante até 24 horas, entre 15 °C e 30 °C, ou até 14 dias, entre 2 °C e 8 °C ou até 60 dias, entre -15 °C e -25 °C, ou após 3 ciclos de congelação/descongelação, quando armazenadas entre -15 °C e -25 °C. O ADN extraído deve ser amplificado dentro dos períodos de armazenamento recomendados ou antes do fim do prazo de validade do cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para extrair o ADN, o que primeiro se verificar.

AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO

NOTA: para evitar a contaminação da mistura principal de trabalho com amostras de ADN, a amplificação e deteção deverá ser efetuada numa área separada do Isolamento do ADN. A área de trabalho da amplificação e deteção deverá ser limpa a fundo antes da preparação da mistura principal de trabalho. Para uma limpeza adequada, todas as superfícies, incluindo racks e pipetas, deverão ser cuidadosamente limpas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, limpando a seguir com uma solução de etanol a 70%. A lixívia líquida doméstica contém habitualmente hipoclorito de sódio a uma concentração de 5,25%. Uma diluição de lixívia doméstica de 1:10 irá dar origem a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.

Configuração do equipamento

Para instruções de operação detalhadas do **cobas z** 480 analyzer, consulte o Manual do operador do **cobas**[®] 4800 System ou a Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System.

Configuração do pedido de teste

Para os passos do fluxo de trabalho do teste **cobas** BRAF, consulte o Manual do operador do **cobas**[®] 4800 System ou a Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System.

Cálculo da diluição do stock de ADN de amostra

Só é executada uma amplificação/deteção por amostra, usando 25 µl de uma diluição de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng no total). As instruções a seguir descrevem como preparar um mínimo de 35 µl de stock de ADN diluído a 5 ng/µl, consoante a concentração inicial de stock de ADN. Esse procedimento assegura que cada amostra utiliza um mínimo de 5 µl de stock de ADN, para evitar a variação que pode ocorrer ao pipetar menores volumes de amostra.

Cálculo da diluição do stock de ADN de amostra a concentrações de 5 ng/µl a 35 ng/µl

NOTA: os stocks de ADN de amostras deverão ser diluídos imediatamente antes da amplificação e deteção.

NOTA: só é executada uma amplificação/deteção por amostra, usando 25 µl de uma diluição de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng no total).

A. Para cada amostra, determine a quantidade de stock de ADN necessário utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de stock de ADN necessário} = (35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentração de stock de ADN em ng}/\mu\text{l}$$

B. Para cada amostra, determine a quantidade necessária de Diluente de Amostras de ADN (**DNA SD**) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de DNA SD necessário em } \mu\text{l} = (35 \mu\text{l} - \text{Volume de stock de ADN necessário em } \mu\text{l})$$

Exemplo:

Concentração de stock de ADN = 21 ng/µl

A. Volume de stock de ADN necessário = $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 21 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8,3 \mu\text{l}$

B. Volume de DNA SD necessário em µl = $(35 \mu\text{l} - 8,3 \mu\text{l}) = 26,7 \mu\text{l}$

Cálculo da diluição do stock de ADN de amostra a concentrações > 35 ng/µl

NOTA: os stocks de ADN de amostras deverão ser diluídos imediatamente antes da amplificação e deteção.

NOTA: só é executada uma amplificação/deteção por amostra, usando 25 µl de uma diluição de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng no total).

A. A concentrações de stock de ADN > 35 ng/µl, utilize a seguinte fórmula para calcular a quantidade de Diluente de Amostras de ADN (**DNA SD**) necessária para preparar pelo menos 35 µl de stock de ADN diluído. Isto é para garantir que cada amostra utiliza um mínimo de 5 µl de stock de ADN.

$$\text{Vol. de DNA SD necessário em } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l de stock de ADN} \times \text{concentração de stock de ADN em ng}/\mu\text{l}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

B. Utilize o volume calculado de **DNA SD** para diluir 5 µl de stock de ADN.

Exemplo:

Concentração de stock de ADN = 42 ng/µl

A. Vol. de DNA SD necessário em µl = $[(5 \mu\text{l} \times 42 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 37 \mu\text{l}$

B. Utilize o volume calculado de **DNA SD** para diluir 5 µl de stock de ADN.

Diluição de amostra

A. Prepare o número apropriado de tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para as diluições de stock de ADN de amostras, identificando adequadamente as amostras na área de adição de amostras.

B. Utilizando uma pipeta com ponta resistente aos aerossóis, pipete o volume calculado de Diluente de Amostras de ADN (**DNA SD**) para cada tubo de amostra identificado.

C. Misture com agitação forte cada stock de ADN de amostra durante 10 segundos.

- D. Utilizando uma pipeta com ponta resistente a aerossóis, pipete cuidadosamente o volume calculado de stock de ADN de cada amostra no tubo corretamente identificado contendo **DNA SD**. Utilize uma nova ponta de pipeta para cada amostra.
- E. Coloque a tampa e misture com agitação forte durante 10 segundos cada stock de ADN de amostra diluído.
- F. Mude de luvas.

Preparação da Mistura Principal (MMX) de Trabalho

NOTA: a Mistura Oligo BRAF e a MMX de trabalho são sensíveis à luz. Todas as misturas abertas de BRAF OM e MMX de trabalho deverão estar protegidas da exposição prolongada à luz.

- A. Calcule o volume de **RXNMIX** necessário utilizando a seguinte fórmula:
 Volume de **RXNMIX** necessário = (Número de amostras + 2 Controlos + 1) × 10 µl
- B. Calcule o volume de **BRAF OM** necessário utilizando a seguinte fórmula:
 Volume de **BRAF OM** necessário = (Número de amostras + 2 Controlos + 1) × 8 µl
- C. Calcule o volume de **MGAC** necessário utilizando a seguinte fórmula:
 Volume de **MGAC** necessário = (Número de amostras + 2 Controlos + 1) × 7 µl

A Tabela 1 pode ser utilizada para determinar os volumes de cada reagente necessários para a preparação da MMX de trabalho, com base no número de amostras incluídas na corrida.

Tabela 1

		Volumes de reagentes necessários para a MMX de trabalho									
		N.º de amostras*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µl	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µl	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Vol. Total (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* N.º de amostras + 2 Controlos + 1

- D. Retire o número apropriado de frascos de **RXNMIX**, **BRAF OM** e **MGAC** do armazenamento entre 2 e 8 °C. Misture com agitação forte cada reagente durante 5 segundos para recolher o líquido no fundo do tubo antes de utilizar. Rotule um tubo de microcentrifuga esterilizado para a mistura principal (MMX) de trabalho.
- E. Adicione o volume calculado de **RXNMIX** ao tubo de MMX identificado.
- F. Adicione o volume calculado de **BRAF OM** ao tubo de MMX identificado.
- G. Adicione o volume calculado de **MGAC** ao tubo de MMX identificado.
- H. Misture com agitação forte o tubo durante 5 segundos para garantir uma mistura adequada.
- NOTA: utilize apenas a Microplaca (placa AD) e a Película Vedante (Roche M/N: 05232724001) do cobas® 4800 System.**
- I. Adicione cuidadosamente 25 µl de MMX de trabalho a cada poço de reação da placa AD que é necessário para a corrida. Não deixe que a ponta da pipeta toque no exterior da placa desse poço.

Adição de controlos e amostras

- A. Adicione 25 µl de Controlo **BRAF MUT** à posição **A01** da placa AD e misture bem utilizando a pipeta para aspirar e dispensar dentro do poço um mínimo de duas vezes.
- B. Utilizando uma nova ponta de pipeta, adicione 25 µl de Controlo **BRAF WT** à posição **B01** da placa AD e misture bem utilizando a pipeta para aspirar e dispensar dentro do poço um mínimo de duas vezes.

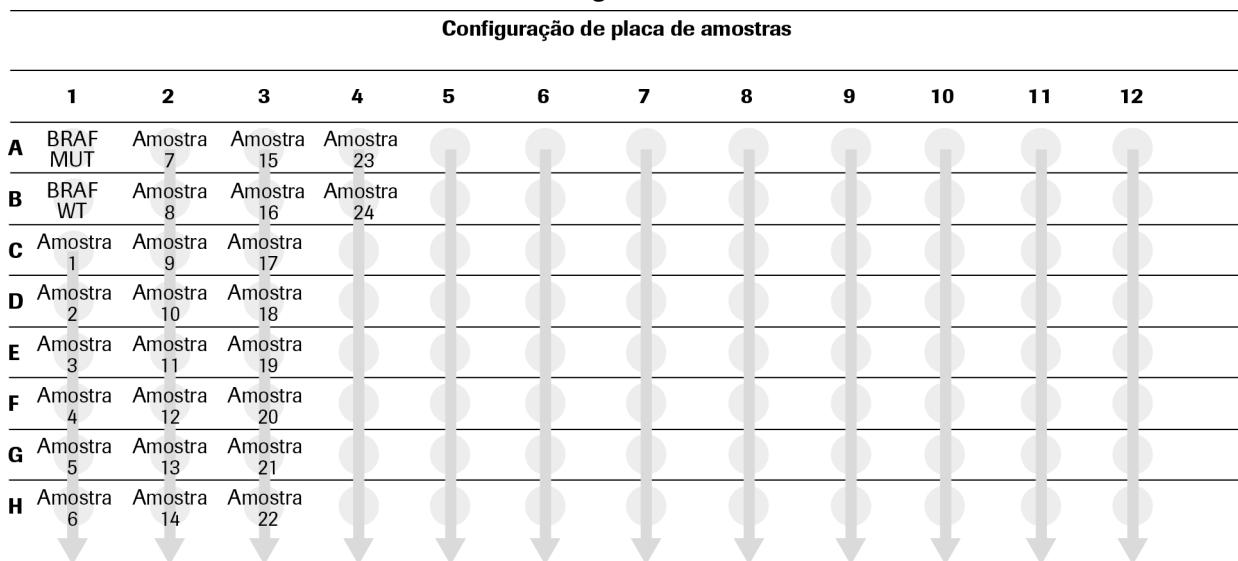
NOTA: cada corrida deve conter um controlo BRAF MUT na posição A01 e um controlo BRAF WT na posição B01, caso contrário a corrida será invalidada pelo cobas z 480 analyzer.

NOTA: mude de luvas conforme for necessário, para proteger contra contaminação de amostra para amostra e contaminação do exterior do tubo de reação da PCR.

- C. Utilizando uma pipeta com ponta resistente aos aerossóis, adicione 25 µl de ADN de amostra diluído ao reservatório apropriado que contém MMX de trabalho, a começar da posição **C01** da placa AD e seguindo o modelo indicado na Figura 1 a seguir. Misture o conteúdo do reservatório utilizando a pipeta para aspirar e dispensar dentro do reservatório um mínimo de duas vezes. Certifique-se de que todo o líquido se deposita no fundo do poço.

NOTA: as amostras de ADN e os controlos têm de ser adicionados à placa AD no prazo de 1 hora após a preparação da Mistura Principal (MMX) de trabalho.

Figura 1



- D. Continue até todas as amostras terem sido adicionadas à placa AD.
- E. Cubra a placa AD com película selante (fornecida com as placas). Utilize o aplicador de película vedante para garantir que a película vedante adira firmemente à placa AD.
- F. Confirme que todo o líquido fica no fundo de cada poço antes de iniciar a amplificação e deteção.

NOTA: a amplificação e deteção deverá ser iniciada no prazo de 1 hora após a adição do ADN da amostra e dos controlos à MMX de trabalho.

Iniciar a PCR

Para instruções detalhadas sobre os passos do fluxo de trabalho do BRAF, consulte o Manual do operador do **cobas**[®] 4800 System ou a Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System.

Interpretação dos resultados

NOTA: a validação de todas as corridas e amostras é efetuada pelo cobas[®] 4800 BRAF AP software.

NOTA: uma corrida válida poderá incluir resultados de amostras válidos e inválidos.

Para uma corrida válida, os resultados de amostra são interpretados conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2
Interpretação dos resultados das amostras

Resultado do teste cobas BRAF	Interpretação
Mutation Detected	Mutação V600 detetada na região do códon 600 do BRAF no exão 15
Mutation Not Detected ou No Mutation Detected*	Mutação V600 não detetada na região do códon 600 do BRAF no exão 15
Invalid	O resultado é inválido. Repita os testes das amostras com resultados inválidos, seguindo as instruções descritas na secção Repetição de testes de amostras com resultados inválidos a seguir.
Failed	A corrida falhou devido a falha de hardware ou de software

* Um resultado "Mutation Not Detected" ou "No Mutation Detected" não exclui a presença de uma mutação na região do códon 600 do BRAF porque os resultados dependem do número de cópias de sequências mutantes presentes na amostra, podendo ser afetados pela integridade da amostra, pela quantidade de ADN isolado e pela presença de substâncias interferentes.

Repetição de testes de amostras com resultados inválidos

A. Repita a diluição do stock de ADN de amostra inválida, a começar com os procedimentos **Cálculo da diluição do stock de ADN de amostra** e **Diluição de amostra** na secção **AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO**.

Nota: *se não sobrar stock de ADN de amostra suficiente para fazer uma nova diluição do stock de ADN, obtenha uma nova secção de 5 µm de tecido e volte a isolar ADN utilizando o cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) e, em seguida, prossiga com o passo B descrito a seguir.*

B. Depois de efetuar a diluição de stock de ADN para 5 ng/µl descrita em **Diluição de amostra**, efetue uma diluição 1:2 adicional, tirando 20 µl do stock de ADN diluído e adicionando 20 µl de Diluente de Amostras de ADN (**DNA SD**).

C. Continue com **Preparação da Mistura Principal (MMX) de Trabalho** e o resto do procedimento de amplificação e deteção.

Nota: *se a amostra permanecer inválida após a repetição do teste a uma diluição de 1:2, repita todo o procedimento de teste para essa amostra, começando com o isolamento do ADN utilizando o cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) com uma nova secção de FFPE de 5 µm. Para a amplificação e deteção, devem ser utilizados os 25 µl padrão de ADN a 5 ng/µl (sem mais diluição).*

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo **cobas BRAF Test Mutant (BRAFMUT)** e o controlo Wild-type (**BRAF WT**) são incluídos em cada corrida. Uma corrida é válida se tanto o reservatório do Controlo **BRAFMUT (A01)** como o reservatório do Controlo **BRAF WT (B01)** tiverem um estado de controlo válido. Se qualquer um dos dois controlos, o Controlo **BRAFMUT** ou o Controlo **BRAF WT** for inválido, a corrida tem de ser repetida. Prepare uma diluição fresca do stock de ADN de amostra anteriormente isolado, para configurar uma nova placa de AD com controlos para amplificação e deteção.

Controlo Mutante de BRAF

O resultado do Controlo **BRAFMUT** tem de ser “Valid”. Se os resultados do Controlo **BRAFMUT** forem, de forma consistente, inválidos, contacte o seu representante local da Roche, para obter assistência técnica.

Controlo Wild-type BRAF

O resultado do Controlo **BRAF WT** tem de ser “Valid”. Se os resultados do Controlo **BRAF WT** forem, de forma consistente, inválidos, contacte o seu representante local da Roche, para obter assistência técnica.

PRECAUÇÕES DE PROCEDIMENTO

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, a prática de uma boa técnica laboratorial é essencial para um desempenho adequado deste ensaio. Em virtude da elevada sensibilidade analítica dos testes baseados na PCR, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação isentas de contaminação.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. Teste unicamente os tipos de amostra indicados. O teste **cobas BRAF** foi validado para utilização apenas com amostras de FFPE de PTC e de melanoma.
2. O teste **cobas BRAF** foi validado utilizando apenas o **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (Roche M/N: 05985536190) para extrair ADN genómico.
3. A deteção de uma mutação depende do número de cópias de sequências mutantes presentes na amostra e pode ser afetada pela integridade da amostra, pela quantidade de ADN isolado e pela presença de substâncias interferentes.
4. A obtenção de resultados fiáveis está dependente da fixação, transporte, armazenamento e processamento adequados das amostras. Siga os procedimentos indicados no presente folheto informativo e no Manual do operador do **cobas® 4800 System** ou na Assistência ao utilizador do **cobas® 4800 System**.
5. A adição de enzima AmpErase à Mistura de reação do teste **cobas BRAF** permite a amplificação seletiva do ADN alvo; no entanto, para evitar a contaminação dos reagentes, é necessário observar boas práticas de laboratório e cumprir rigorosamente os procedimentos especificados neste folheto informativo.
6. A utilização deste produto deve estar limitada a pessoal com formação em técnicas de PCR e na utilização do **cobas® 4800 System**.
7. Apenas o **cobas® 4800 System** foi validado para utilização com este produto. Nenhum outro sistema PCR foi validado com este produto.
8. Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudarem de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas.
9. Não foram avaliados os efeitos de outras potenciais variáveis, tais como variáveis de fixação de amostras.
10. Embora raras, as mutações e variantes dentro das regiões do gene BRAF abrangidas pelos primers ou sondas utilizados no teste **cobas BRAF** podem resultar na impossibilidade de amplificar o alelo V600 do BRAF ou de detetar a presença de mutações no códon 600.
11. A presença de inibidores da PCR pode causar resultados falsos negativos ou inválidos.
12. A melanina é um inibidor conhecido das reações PCR. O kit de preparação de amostras de ADN remove a melanina da amostra durante a extração; no entanto, mesmo assim, a melanina numa amostra pode causar resultados inválidos. Em caso de suspeita de inibição pela melanina, sugere-se a repetição do teste utilizando uma diluição de 1:2, conforme descrito em “Repetição de testes de amostras com resultados inválidos”.

13. O **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test mostra uma reatividade cruzada limitada com amostras de mutantes não V600E (V600K, V600D e V600E2). Para mais informações, consulte a secção “Melanoma – Avaliação do desempenho não clínico”.
14. Amostras de FFPET que contenham ADN degradado podem afetar a capacidade do teste em detetar a mutação.
15. O **cobas** 4800 BRAF Mutation Test é um teste qualitativo. O teste não se destina a medições quantitativas de mutações.

I. MELANOMA

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

Para os estudos não clínicos descritos abaixo, a % de conteúdo tumoral foi avaliada por exame patológico, e o teor de melanina foi avaliado por exame patológico e um ensaio “in-house” para determinação da melanina. A sequenciação Sanger bidirecional foi utilizada para selecionar as amostras para teste. A % de nível de mutação foi determinada utilizando a sequenciação 454 (método quantitativo de pirosequenciação massivamente paralela).

Sensibilidade analítica

Sensibilidade analítica – Limite de Detecção (LoD)

Foi avaliada a quantidade mínima de ADN de entrada que produz resultados corretos 95% das vezes, utilizando painéis de diluição preparados a partir de três tipos de amostras:

- Misturas de amostras preparadas misturando stocks de ADN obtidos de amostras de FFPET de mutantes V600E do BRAF e amostras de FFPET de wild-type BRAF para atingir níveis de mutação específicos.
- Stocks de ADN de amostras de FFPET individuais preparadas a partir de três amostras de FFPET de mutantes V600E do BRAF.
- Mistura de linhas de células preparada misturando stocks de ADN obtidos de uma linha de células de mutante V600E do BRAF e uma linha de células de wild-type BRAF.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram sequenciadas por sequenciação 454 de modo a determinar a percentagem de mutação de cada amostra.

Sensibilidade analítica utilizando misturas de amostras

Stocks de ADN de amostras de FFPET de mutante V600E do BRAF foram misturados com stocks de ADN de amostras de FFPET de wild-type BRAF para obter uma amostra a ~10%, três amostras a ~5% e uma amostra a nível de mutação ~3%. Também foi testada uma amostra de wild-type BRAF. Após a mistura, os níveis de mutação foram verificados por sequenciação 454. Cada uma das cinco misturas de amostras com mutação V600E (mas não a amostra wild-type) foi depois diluída para produzir os membros de painel especificados na Tabela 3.

Tabela 3
Preparação de membros do painel de diluição de misturas de amostras

Mistura	Mutação média (%)*	Quantidade de ADN nos membros do painel de diluição (ng/25 µl)**
Mistura a 10%	9% (n = 6)	125; 62,5; 31,3
Mistura 1 a 5%	5% (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mistura 2 a 5%	5% (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mistura 3 a 5%	6% (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mistura a 2,5%	3% (n = 5)	125; 62,5; 31,3
0% (apenas wild-type)	- - -	125

* Percentagem média de mutação da mistura, testada por sequenciação 454.

** Quantidade de ADN genómico contido em cada membro do painel. 25 µl é o volume de entrada de amostra para o teste.

8 réplicas de cada membro do painel foram executadas utilizando 3 lotes do kit do teste **cobas** BRAF (n = 24/membro de painel). A Tabela 4 indica a sensibilidade de cada mistura de FFPET, determinada pela menor quantidade de ADN que originou uma taxa de “Mutation Detected” do V600E do BRAF de pelo menos 95% (linhas sombreadas).

Tabela 4
Sensibilidade do teste cobas BRAF utilizando misturas de FFPET

Mistura de FFPET	Porcentagem de mutação por sequenciação 454	Quantidade de ADN no membro do painel	Taxa de “Mutation Detected” (n = 24)
Mistura de FFPET a 10%	9%	125 ng/25 µl	100%
		62,5 ng/25 µl	100%
		31,3 ng/25 µl	100%
Mistura de FFPET 1 a 5%	5%	125 ng/25 µl	96%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	75%
		0,6 ng/25 µl	88%
		0,3 ng/25 µl	71%
Mistura de FFPET 2 a 5%	5%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	92%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	96%
		0,6 ng/25 µl	58%
		0,3 ng/25 µl	50%
Mistura de FFPET 3 a 5%	6%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	100%
		0,6 ng/25 µl	96%
		0,3 ng/25 µl	71%
Mistura de FFPET a 2,5%	3%	125 ng/25 µl	0%
		62,5 ng/25 µl	4%
		31,3 ng/25 µl	4%
0% (wild-type)	---	125 ng/25 µl	0%

Este estudo demonstra que o teste **cobas** BRAF pode detetar a mutação V600E do BRAF a um nível de mutação $\geq 5\%$ utilizando a entrada padrão de 125 ng/25 µl. A capacidade do teste de detetar a mutação em níveis mais baixos de entrada de ADN demonstra que as amostras podem conter ADN degradado devido ao processo de fixação e ainda assim a mutação ser detetada. Todos os resultados obtidos da amostra wild-type BRAF eram “Mutation Not Detected”.

Sensibilidade analítica utilizando amostras de FFPET

Para confirmar a indicação de detecção de mutação de 5% em amostras de pacientes, 48 secções individuais de 5 µm de cada uma de 3 amostras de FFPET com mutação V600E do BRAF contendo níveis de mutação de 6%, 12% e 4% foram processadas individualmente utilizando 3 lotes do **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit para isolar o ADN. Para avaliar o impacto da melanina no ensaio, uma amostra (mutação de 6%) tinha uma alta concentração de melanina. Foram preparadas diluições em série do ADN de cada secção para produzir um conjunto de 6 membros de painel detalhados na Tabela 5.

Tabela 5
Preparação de membros do painel de diluição de amostras de FFPET

Amostra de FFPET	Informação da amostra		Quantidade de ADN nos membros do painel de diluição (ng/25 µl)
	Mutação V600E média (%)*	Pigmentação	
Amostra 1	6%	Altamente pigmentada**	125; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0
Amostra 2	12%	NAP***	125; 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5
Amostra 3	4%	NAP	125; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0

* Percentagem média de mutação da amostra, determinada por sequenciação 454

** Altamente pigmentada com base em avaliação visual, concentração de Melanina = 0,17 µg/25 µl

*** NAP = Não Altamente Pigmentada, com base em avaliação visual

16 réplicas de cada membro do painel foram executadas utilizando 3 lotes do kit do teste **cobas** BRAF (n = 48/membro de painel). A sensibilidade de cada amostra de FFPET foi determinada pela menor quantidade de ADN que originou uma taxa de "Mutation Detected" do V600E do BRAF de pelo menos 95% (linhas sombreadas). Os resultados do estudo são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6
Sensibilidade do teste cobas BRAF utilizando amostras de FFPET

Amostra de FFPET	Percentagem de mutação por sequenciação 454	Quantidade de ADN no membro do painel	Taxa de "Mutation Detected" (n = 48)
Amostra 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	98%
		2,0 ng/25 µl	81%
		1,0 ng/25 µl	71%
Amostra 2	12%	125 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	100%
		3,9 ng/25 µl	100%
		2,0 ng/25 µl	98%
		1,0 ng/25 µl	98%
		0,5 ng/25 µl	94%
Amostra 3	4%	125 ng/25 µl	98%
		31,3 ng/25 µl	98%
		15,6 ng/25 µl	85%
		7,8 ng/25 µl	90%
		3,9 ng/25 µl	90%
		2,0 ng/25 µl	67%

O estudo demonstrou que o teste **cobas** BRAF pode detetar a mutação V600E do BRAF em amostras clínicas de FFPET reais a um nível de mutação ≥ 5% utilizando a entrada padrão de 125 ng/25 µl. A capacidade do teste de detetar a mutação em níveis mais baixos de entrada de ADN demonstra que as amostras podem conter ADN degradado devido ao processo de fixação e ainda assim a mutação ser detetada. Uma amostra altamente pigmentada incluída no estudo parecia não afetar a sensibilidade do teste.

Sensibilidade analítica utilizando mistura de linhas de células

Stocks de ADN de duas linhas de células de melanoma [SK-MEL 28 (mutante V600E do BRAF) e SK-MEL 2 (wild-type BRAF)] foram misturados para obter uma amostra a 5% de mutação, verificada por sequenciação 454. Foram preparados 3 painéis de diluição separados contendo entre 125 ng/25 µl e 0 ng/25 µl de ADN. 20 réplicas de cada membro do painel foram testadas utilizando os 3 lotes do kit do teste **cobas** BRAF (60 réplicas no total). A sensibilidade foi determinada pela menor quantidade de ADN que originou uma taxa de “Mutation Detected” do V600E do BRAF de pelo menos 95% (linha sombreada). Os resultados do estudo são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7
Sensibilidade do teste cobas BRAF utilizando mistura de linhas de células

Mistura de linhas de células	Porcentagem média de mutação por sequenciação 454	Quantidade de ADN no membro do painel	Taxa de “Mutation Detected” (n = 60)
Mistura de linhas de células	5%	125,0 ng/25 µl	97%
		31,3 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	95%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	95%
		2,0 ng/25 µl	82%
		1,0 ng/25 µl	78%
		0,5 ng/25 µl	77%

O teste **cobas** BRAF originou uma taxa de “Mutation Detected” de 95% a 3,9 ng/25 µl, que representa uma diluição de 1:32 da entrada de ADN recomendada de 125 ng/25 µl. Isto indica que o teste detetará a mutação V600E do BRAF quando ~97% do ADN estiver degradado devido ao processo de fixação, assumindo que o ADN da linha de células continha 100% de ADN intacto e amplificável.

Intervalo de entrada genómica

A entrada de ADN recomendada para o teste **cobas** BRAF é de 125 ng. Diferentes quantidades de entrada de ADN genómico podem resultar de erros de quantificação de ADN e/ou de variação na quantidade de ADN degradado. Para avaliar os efeitos de várias quantidades de entrada de ADN genómico, foi extraído ADN genómico de 11 amostras de FFPET de melanoma, selecionadas pelo seu estado de mutação e nível de pigmentação, e diluídas em série com entradas de amostra representando 250 ng, 125 ng, 62,5 ng e 31,3 ng/25 µl. Todos os 4 níveis de ADN foram avaliados utilizando 2 lotes. Foram obtidos os resultados esperados para todos os níveis de entrada de ADN genómico.

Conteúdo tumoral mínimo

Foram testadas 33 amostras de mutante V600E do BRAF para determinar a proporção de tumor mínima necessária para detetar a mutação V600E do BRAF em amostras com conteúdo tumoral de 5% a 50%, sem macro dissecação. Foi testada 1 secção de cada amostra utilizando o teste **cobas** BRAF.

O teste **cobas** BRAF detetou corretamente todas as amostras com mutação V600E do BRAF que tinham um ADN mutante de % mínima acima de 5% e quando o conteúdo tumoral mínimo era de pelo menos 15%, conforme mostrado na Tabela 8. As amostras com um conteúdo tumoral inferior a 15% e um nível de mutação inferior a 5% foram relatadas como “Mutation Not Detected”. 24 amostras wild type adicionais com um conteúdo tumoral entre 5 e 45% foram também avaliadas à concentração de ADN de entrada recomendada de 125 ng/25 µl. Todas as amostras wild type obtiveram um resultado correto. É necessário fazer a macrodissecação de amostras que contenham < 50% de conteúdo tumoral por área.

Tabela 8
Resultados de teste de 33 amostras de V600E do BRAF com várias percentagens de conteúdo tumoral e percentagens de mutação

Número de amostra	Conteúdo tumoral*	% de mutação	Resultado do teste
1	5%/5%	3%	Mutation Not Detected
2	5%/5%	5%	Mutation Not Detected
3	5%/5%	1%	Mutation Not Detected
4	10%/10%	4%	Mutation Not Detected
5	10%/10%	14%	Mutation Detected
6	15%/10%	6%	Mutation Detected
7	15%/15%	23%	Mutation Detected
8	15%/15%	3%	Mutation Detected

Número de amostra	Conteúdo tumoral*	% de mutação	Resultado do teste
9	15%/15%	29%	Mutation Detected
10	15%/15%	14%	Mutation Detected
11	15%/15%	14%	Mutation Detected
12	15%/20%	5%	Mutation Detected
13	20%/20%	28%	Mutation Detected
14	20%/20%	2%	Mutation Detected
15	25%/20%	13%	Mutation Detected
16	25%/25%	25%	Mutation Detected
17	30%/25%	20%	Mutation Detected
18	30%/30%	10%	Mutation Detected
19	30%/35%	4%	Mutation Detected
20	30%/35%	17%	Mutation Detected
21	35%/30%	8%	Mutation Detected
22	35%/35%	7%	Mutation Detected
23	35%/35%	12%	Mutation Detected
24	35%/35%	22%	Mutation Detected
25	35%/40%	36%	Mutation Detected
26	40%/35%	7%	Mutation Detected
27	40%/35%	12%	Mutation Detected
28	40%/40%	14%	Mutation Detected
29	40%/40%	21%	Mutation Detected
30	40%/40%	28%	Mutation Detected
31	40%/45%	36%	Mutation Detected
32	45%/45%	10%	Mutation Detected
33	50%/40%	8%	Mutation Detected

** O conteúdo tumoral da amostra foi avaliado examinando a primeira e a última de doze secções de 5 µm adjacentes de cada amostra por um patologista. É mostrado o conteúdo tumoral da primeira e última secções (por exemplo, 95%/95%).*

Reatividade cruzada

A reatividade cruzada do teste **cobas** BRAF foi avaliada testando os seguintes tipos de amostras:

- Amostras de FFPET de melanoma com mutação não V600E do BRAF com vários níveis de mutação,
- Plasmídeos de mutações não V600E do BRAF,
- Plasmídeos de homólogos BRAF,
- Microrganismos relacionados com a pele.

A reatividade cruzada foi também avaliada determinando se a presença de plasmídeos de homólogos BRAF ou de micro-organismos relacionados com a pele interferiram com a deteção da mutação V600E do BRAF.

Amostras de FFPET de melanoma não V600E do BRAF

14 amostras de FFPET de melanoma com mutações não V600E do BRAF (V600D, V600E2, V600R ou V600K) foram testadas em triplicado com o teste **cobas** BRAF. Para oito das amostras não V600E do BRAF, as 3 réplicas mostraram reatividade cruzada com o teste **cobas** BRAF. Essas 8 amostras eram: mutação V600D do BRAF (18% de mutação), mutação V600E2 do BRAF (68% de mutação) ou mutação V600K do BRAF (mutação superior a 30%). Não foi observada reatividade cruzada com a amostra com mutação V600R do BRAF (23% de mutação), conforme indicado na Tabela 9.

Tabela 9

Taxas de detecção de mutação do teste cobas BRAF observadas para mutações não V600E do BRAF em amostras de FFPET

Número de amostra	Estado de mutação BRAF	Porcentagem de mutação	Conteúdo tumoral*	Estadio do tumor	Taxa de "Mutation Detected" (n = 3)
1	V600D	18%	30%/30%	IV	100%
2	V600E2	16%	75%/75%	IV	0%
3		36%	75%/80%	III	0%
4		68%	75%/75%	IV	100%
5	V600R	23%	15%/15%	IV	0%
6	V600K	17%	25%/25%	III	0%
7		22%	35%/40%	IV	0%
8		23%	40%/40%	IV	0%
9		31%	60%/60%	IV	100%
10		35%	75%/75%	IV	100%
11		39%	80%/80%	IV	100%
12		36%	95%/95%	IIC	100%
13		62%	75%/75%	IV	100%
14	69%	80%/80%	IV	100%	

* O conteúdo tumoral da amostra foi avaliado examinando a primeira e a última de doze secções de 5 µm adjacentes de cada amostra por um patologista. É mostrado o conteúdo tumoral da primeira e última secções (por exemplo, 95%/95%).

Foi preparado um painel de diluição de 11 membros com concentrações de ADN que variavam entre 5,0 ng/µl e um mínimo de 0,0049 ng/µl (que corresponde a entre 125 e 0,1 ng de DNA do volume de entrada de 25 µl para o teste) e cada membro do painel foi testado em triplicado para determinar a menor quantidade de ADN que originou uma taxa de "Mutation Detected" de 100% para as 8 amostras em que se verificou reação cruzada no teste **cobas** BRAF. Foi observado que o menor nível de entrada de ADN antes de uma perda em reatividade cruzada variava entre 0,5 ng/25 µl para uma amostra de mutante V600K do BRAF com mutação de 69%, e 15,6 ng/25 µl para uma amostra de mutante V600D do BRAF com mutação de 18% (Tabela 10).

Tabela 10

Menor entrada de ADN para detetar reatividade cruzada do teste cobas BRAF

Número de amostra	Estado de mutação BRAF	Porcentagem de mutação	Quantidade mais baixa de entrada de ADN antes de perda de reatividade cruzada (n = 3)
1	V600D	18%	15,6 ng/25 µl
2	V600E2	68%	7,8 ng/25 µl
3	V600K	31%	3,9 ng/25 µl
4		35%	3,9 ng/25 µl
5		39%	3,9 ng/25 µl
6		36%	2,0 ng/25 µl
7		62%	3,9 ng/25 µl
8		69%	0,5 ng/25 µl

Plasmídeos não V600E do BRAF

Painéis de diluição de plasmídeos com níveis de mutação que variam entre 5% e 75% num fundo de plasmídeo wild-type foram preparados para as seguintes 9 mutações não V600E do BRAF: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K e V600R. 3 réplicas de cada membro dos painéis de diluição preparados para cada plasmídeo foram testadas utilizando o teste **cobas** BRAF. Foi observada reatividade cruzada nas 3 réplicas com plasmídeo BRAF V600D com $\geq 10\%$ de mutação, plasmídeo BRAF V600K com $\geq 35\%$ de mutação e plasmídeo BRAF V600E2 com $\geq 65\%$ de mutação. Não se observou nenhuma reatividade cruzada com plasmídeos das outras seis mutações BRAF testadas.

Plasmídeos de homólogos BRAF

Foram preparadas amostras para 3 plasmídeos de homólogos BRAF (BRAF Pseudogene, ARAF e RAF1), plasmídeo de mutante V600E do BRAF e plasmídeo de wild-type BRAF, conforme indicado na Tabela 11. Foram testados 3 a 6 réplicas de cada membro do painel utilizando o teste **cobas** BRAF.

Tabela 11
Amostras de plasmídeos de homólogos BRAF

Nível do		Composição por Volume	
Nome	Membro	Componente 1	Componente 2
BRAF Pseudogene	1	95% BRAF Pseudogene	5% Mutante V600E do BRAF
	2	100% BRAF Pseudogene	---
ARAF	1	95% ARAF	5% Mutante V600E do BRAF
	2	100% ARAF	---
RAF1	1	95% RAF1	5% Mutante V600E do BRAF
	2	100% RAF1	---
Controlo	1	95% Wild-type BRAF	5% Mutante V600E do BRAF
	2	100% Wild-type BRAF	---
	3	95% Tampão de eluição de ADN	5% Mutante V600E do BRAF

Nenhum dos três plasmídeos homólogos BRAF testados foi detetado pelo teste **cobas** BRAF quando testado sozinho, indicando que os plasmídeos homólogos BRAF não reagem de forma cruzada com o teste.

O plasmídeo com mutação V600E do BRAF a 5% na presença de 95% dos plasmídeos homólogos BRAF deu o resultado "Mutation Detected" previsto em todos os casos, indicando que os plasmídeos homólogos não interferiram com a deteção da mutação V600E do BRAF.

Microrganismos relacionados com a pele

Não se verificou reatividade cruzada dos seguintes micro-organismos relacionados com a pele no teste **cobas** BRAF quando adicionados a uma amostra de FFPE de melanoma wild-type a 1×10^6 CFU (unidades de formação de colónias) durante o passo de lise do tecido:

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

Os micro-organismos testados também não interferiram com a deteção de uma amostra de FFPE com mutação V600E do BRAF de 8% quando 1×10^6 CFU (unidades de formação de colónias) foram adicionadas durante o passo de lise do tecido.

Interferência

Triglicéridos (≤ 74 mM, $2 \times$ a concentração elevada recomendada pelo CLSI¹⁷), hemoglobina (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ a concentração elevada recomendada pelo CLSI¹⁷) e $\leq 95\%$ de tecido necrótico mostraram não interferir com o teste **cobas** BRAF quando a substância potencialmente interferente foi adicionada ao passo de lise durante o procedimento de preparação de amostra.

Melanina

Foi avaliado o impacto de concentrações elevadas de melanina endógena utilizando amostras de FFPET de melanoma altamente pigmentadas. Foram selecionadas 41 amostras de FFPET individuais de tecido de tumor de melanoma, com base no respetivo nível de pigmentação: 33 eram altamente pigmentadas, 3 eram de afro-americanos e 5 eram ligeiramente pigmentadas para comparação. Foi extraído ADN do tecido e a concentração de melanina foi determinada para cada amostra. Foi testado 1 única réplica do stock de ADN de cada uma das 2 secções obtidas de cada uma das 41 amostras. 3 amostras produziram resultados inválidos. 1 amostra produziu um resultado “Mutation Not Detected”, mas esta amostra foi determinada estar abaixo do limite de deteção. As 3 amostras com resultados “Invalid” foram utilizadas para preparar a concentração recomendada de ADN para o teste, assim como diluições de 2, 4 e 8 vezes a entrada de ADN recomendada de 125 ng/PCR. As amostras de ADN diluídas resultantes (contendo um total de 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng ou 15,6 ng de DNA nos 25 µl) foram novamente testadas para determinar se a correspondente redução em melanina devido à diluição permitia que fossem obtidos resultados válidos. As 3 amostras produziram os resultados corretos quando numa diluição de 2 vezes.

Tabela 12
Resumo do desempenho do teste cobas BRAF com amostras de FFPET de melanoma pigmentadas

ID da amostra	Diluição	Quantidade de melanina na amostra/PCR	Resultado
1	Nenhuma (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	2 vezes (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	4 vezes (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	8 vezes (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Nenhuma (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	2 vezes (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	4 vezes (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	8 vezes (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Nenhuma (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	2 vezes (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	4 vezes (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	8 vezes (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Os resultados dos testes das 17 amostras wild-type mostraram que foram corretamente atribuídos resultados de “Mutation Not Detected” a todas as amostras, exceto 2 amostras altamente pigmentadas que produziram resultados falsos positivos.

DESEMPENHO CLÍNICO

Reprodutibilidade

Foi efetuado um estudo externo para avaliar a reprodutibilidade do teste **cobas** BRAF em 3 locais diferentes (2 operadores em cada local), 3 lotes de reagente e 5 dias não consecutivos de testes, com um painel de 8 membros de amostras de ADN derivadas de secções de FFPET de melanoma maligna. Este painel incluía tanto amostras pigmentadas como amostras não pigmentadas e uma gama de percentagens de conteúdo tumoral e de percentagens de alelos mutantes, incluindo 1 amostra a 5% do limite de deteção (LoD). Das 94 corridas, 92 (97,9%) foram válidas. Das 1442 amostras testadas, 2 amostras (0,14%) deram resultados inválidos. Para todos os membros do painel, exceto para as amostras LoD, foi obtido o resultado correto para 100% dos testes válidos, incluindo membros do painel de amostras com mutação de 20%, e 2 membros do painel determinaram ser altamente pigmentados. Para o membro do painel LoD, foi detetada a mutação V600E em 90% (162/180) das amostras. Não se observaram falsos-positivos em nenhuma das amostras WT testadas. Resumindo, o teste **cobas** BRAF foi altamente reproduzível tanto nas amostras pigmentadas como nas não pigmentadas, em amostras com baixo conteúdo tumoral e com baixa percentagem de alelos mutantes, e em todos os locais de teste, com todos os operadores e lotes de reagente e em todos os dias de teste. A especificidade analítica foi de 100%.

Correlação para o método de referência para amostras de ensaios clínicos da fase III

A prevalência da mutação V600E no ensaio clínico de fase III foi de 46,5% com base nos resultados com o teste **cobas** BRAF. Isto é consistente com a prevalência do V600E em doentes com melanoma, conforme indicado na literatura.

Para avaliar o desempenho do teste **cobas** BRAF quando comparado com sequenciação Sanger bidirecional 2x, foram identificados 596 pacientes consecutivos, examinados para o ensaio de fase III do vemurafenib, em relação aos quais foram obtidos dados clínicos, demográficos e de sequenciação Sanger. Destes casos, 94 não eram elegíveis devido a falta de critérios de inclusão, 4 casos não tinham exame patológico e 2 casos tiveram resultados inválidos do teste **cobas** BRAF. Dos restantes 496 casos elegíveis, 47 amostras tinham resultados de sequenciação Sanger inválidos, deixando 449 casos suscetíveis de avaliação. A análise de concordância entre os resultados do teste **cobas** BRAF e os resultados da sequenciação Sanger para detecção da mutação V600E é mostrada na Tabela 13 a seguir.

Tabela 13
Resumo dos resultados do teste cobas BRAF vs. sequenciação Sanger

Teste cobas BRAF (método de teste)	Sequenciação Sanger (método de referência)		
	BRAF V600E Mutation Detected ^a	BRAF V600E Mutation Not Detected ^b	Total
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Total	222	227	449
Concordância na percentagem de positivos (IC de 95%)	100% × 216 / 222 = 97,3% (94,2%, 98,8%)		
Concordância na percentagem de negativos (IC de 95%)	100% × 192 / 227 = 84,6% (79,3%, 88,7%)		
Concordância na percentagem geral (IC de 95%)	100% × 408 / 449 = 90,9% (87,8%, 93,2%)		

^a “Mutation Detected” indica a presença do tipo de mutação BRAF predominante, V600E (1799 T>A), conforme identificado por Sanger.

^b “Mutation Not Detected” indica a ausência do tipo de mutação BRAF predominante, V600E, conforme identificado por Sanger (ou seja, wild-type ou sem mutação, V600D, V600E2, V600K, V600R e outras mutações).

Nota: Amostras de melanoma com resultados emparelhados válidos tanto do teste **cobas** BRAF como da sequenciação Sanger.

Nota: IC = (valor) intervalo de confiança.

As 41 amostras que deram resultados discordantes do teste **cobas** BRAF e da sequenciação Sanger, foram todas sujeitas a sequenciação 454 (pirosequenciação massivamente paralela quantitativa) como um segundo método de referência. Além disso, 33 amostras concordantes do teste **cobas** BRAF e da sequenciação Sanger foram testadas com sequenciação 454. A análise secundária de concordância, após resolução dos discordantes, é apresentada na Tabela 14.

Das 6 amostras discordantes que tinham um resultado “Mutation Not Detected” pelo teste **cobas** BRAF e um resultado V600E pela sequenciação Sanger, a sequenciação 454 deu um resultado wild-type em 5 de 6 amostras (uma amostra tinha um resultado 454 inválido).

Das 8 de 35 amostras discordantes que tinham um resultado “Mutation Detected” pelo teste **cobas** BRAF e um resultado WT pela sequenciação Sanger, a sequenciação 454 detetou uma mutação V600E em 7 de 8 amostras (uma amostra tinha um resultado 454 inválido).

Das 27 de 35 amostras discordantes que tinham um resultado “Mutation Detected” pelo teste **cobas** BRAF e um resultado não V600E pela sequenciação Sanger, a sequenciação 454 detetou uma mutação V600K em 24 amostras, um V600E2 numa amostra e um V600E noutra amostra. Em 1 amostra, Sanger detetou uma mutação V600D e a sequenciação 454 deu um resultado wild-type.

A reatividade cruzada do teste **cobas** BRAF para V600K foi de 66% (25/38).

A concordância com a sequenciação 454 foi de 100% para as 33 amostras V600E e WT concordantes do teste **cobas** BRAF e da sequenciação Sanger.

Tabela 14
Resultados do teste cobas BRAF vs. sequenciação Sanger após resolução dos resultados discordantes por sequenciação 454

Teste cobas BRAF (método de teste)	Após resolução dos resultados discordantes por sequenciação 454		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Total
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Total	225	224	449
Concordância na percentagem de positivos (IC de 95%)	100% × 224 / 225 = 99,6% (97,5%, 99,9%)		
Concordância na percentagem de negativos (IC de 95%)	100% × 197 / 224 = 87,9% (83,0%, 91,6%)		
Concordância na percentagem geral (IC de 95%)	100% × 421 / 449 = 93,8% (91,1%, 95,7%)		

Distribuição das mutações BRAF do códon 600

A distribuição das mutações do códon 600 foi determinada em 496 casos elegíveis com base na combinação de resultados Sanger e de sequenciação 454. Destes 496 casos, 182 casos eram wild-type e 314 casos eram mutantes. A distribuição das mutações do códon 600 entre os 314 casos positivos de mutação está ilustrada na Tabela 15. As mutações V600K foram identificadas em 13,4% de todos os casos com mutações do códon 600.

Tabela 15
Distribuição das mutações BRAF do códon 600 da população positiva quanto a mutação, conforme determinado por Sanger e/ou por sequenciação 454

Sequência de aminoácido (Códon 600)	Sequência de nucleótidos (1798–1800)	N	Distribuição (%)
V600E	GAG	255	81,2
V600K	AAG	42	13,4
V600E2	GAA	13	4,1
V600R	AGG	3	1,0
V600D	GAC	1	0,3
Total de mutantes do códon 600		314	100
Total de wild type do códon 600		182	---

Eficácia clínica do ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

O teste **cobas** BRAF foi utilizado como teste complementar para selecionar pacientes para tratamento com ZELBORAF®. A segurança e eficácia clínicas do ZELBORAF® foram demonstradas no estudo NO25026 (BRIM3), um estudo de fase III internacional, aleatório, aberto, controlado e multicêntrico em pacientes com melanoma de grau III ou IV não passível de ressecção com uma mutação BRAF V600E, não tratados anteriormente, para avaliar a eficácia clínica do ZELBORAF® versus dacarbazina (terapia padrão). Amostras de FFPE de todos os pacientes com melanoma suscetíveis de tratamento foram testadas com o teste **cobas** BRAF. Os pacientes com um resultado de teste “Mutation Detected” seriam elegíveis para inscrição no ensaio clínico caso satisfizessem outros critérios de elegibilidade. Os pacientes com um resultado de teste “Mutation Not Detected” não foram elegíveis para inscrição no ensaio clínico. O estudo foi realizado em aproximadamente 104 locais em todo o mundo (22 centros nos EUA).

675 pacientes foram inscritos no ensaio; 337 foram selecionados para receber vemurafenib e 338 para receber dacarbazina. As principais medidas de resultados de eficácia do ensaio foram a sobrevivência global (SG) e a sobrevivência livre de progressão (PFS) avaliada pelo investigador. Outras medidas de resultados incluíram a melhor taxa de resposta global confirmada avaliada pelo investigador.

As características de linha de base foram equilibradas entre os grupos de tratamento. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (56%) e de origem caucasiana (99%), a idade média era 54 anos (24% com idade ≥ 65 anos), todos os pacientes tinham um estado de desempenho ECOG de 0 ou 1 e a maioria dos pacientes tinha doença metastática (95%).

Os resultados de eficácia do ensaio são mostrados abaixo, na Tabela 16 e na Figura 2:

Tabela 16
Eficácia do vemurafenib em pacientes com melanoma positivo para a mutação V600E do BRAF que nunca tinham recebido tratamento^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dacarbazina (N = 338)	Valor de p^d
Sobrevivência global			
Número de óbitos	78 (23%)	121 (36%)	-
Taxa de risco (IC de 95%) ^b	0,44 (0,33; 0,59)		< 0,0001
Mediana de sobrevivência (meses) (IC de 95%) ^c	NR ^e (9,6; NR)	7,9 (7,3; 9,6)	-
Mediana de seguimento (meses) (intervalo)	6,2 (0,4; 13,9)	4,5 (< 0,1; 11,7)	
Taxa de risco da sobrevivência livre de progressão (IC de 95%) ^b	0,26 (0,20; 0,33)		< 0,0001
Mediana da PFS (meses) ^c	5,3 (4,9; 6,6)	1,6 (1,6; 1,7)	-

^a Conforme detetado pelo teste **cobas** BRAF

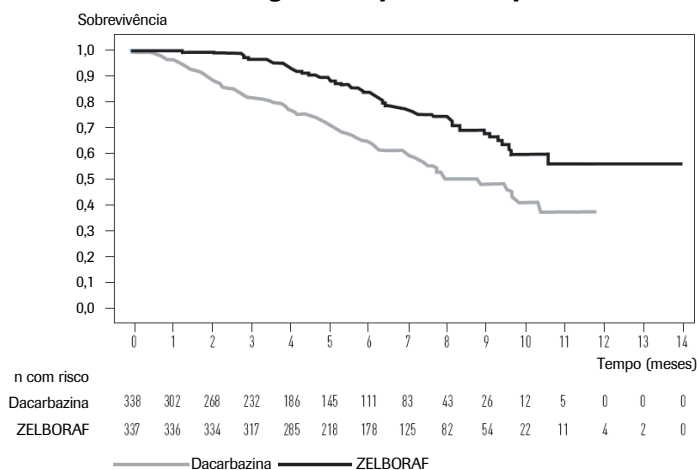
^b Estimativa da taxa de risco utilizando o modelo de Cox; uma taxa de risco < 1 favorece o vemurafenib

^c Estimativa de Kaplan-Meier

^d Teste log-rank não estratificado

^e Não alcançado

Figura 2
Curvas de Kaplan-Meier de sobrevivência global – pacientes que nunca tinham recebido tratamento



A melhor taxa de resposta global confirmada avaliada pelo investigador foi de 48,4% (IC de 95%: 41,6%, 55,2%) no braço do ZELBORAF[®] comparado com 5,5% (IC de 95%: 2,8%, 9,3%) no braço da dacarbazina.

Eficácia clínica do COTELLIC[®] (cobimetinib)^{10, 11}

O COTELLIC[®], um inibidor MEK, foi testado num ensaio clínico (coBRIM) em combinação com ZELBORAF[®] comparado com ZELBORAF[®] mais placebo. O teste **cobas** BRAF foi utilizado para determinar a elegibilidade para inscrição dos pacientes neste ensaio clínico. A segurança e eficácia da combinação de COTELLIC[®] e ZELBORAF[®] foram estabelecidas num estudo multicêntrico, aleatório (1:1), em dupla ocultação, controlado por placebo, realizado em 495 pacientes com melanoma não tratado anteriormente, positivo para a mutação BRAF V600, não passível de resseção ou metastático. O principal resultado de eficácia foi a sobrevivência livre de progressão (PFS) avaliada pelo investigador de acordo com RECIST v1.1. Resultados de eficácia adicionais foram a taxa de resposta objetiva (ORR) confirmada avaliada pelo investigador, a sobrevivência global (SG), PFS conforme avaliada por análise cega centralizada e independente, e a duração da resposta (DOR).

As características de linha de base foram equilibradas entre os grupos de tratamento. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (58%) e de origem caucasiana (93%), a idade média era 55 anos, 72% dos pacientes tinham um estado de desempenho ECOG de 0 e 60% dos pacientes tinha doença de fase M1c.

Amostras de FFPET de todos os pacientes suscetíveis de tratamento foram testadas com o teste **cobas** BRAF. Os pacientes com um resultado “Mutation Detected” seriam elegíveis para inscrição no ensaio caso satisfizessem outros critérios de elegibilidade. Os pacientes com um resultado “No Mutation Detected” não foram elegíveis para inscrição no ensaio. O ensaio incluiu pacientes com mutações V600K do BRAF, conforme detetado pelo teste **cobas** BRAF, demonstrando a segurança e eficácia terapêuticas do produto no segmento detetado da população de pacientes com tumores contendo V600K.

Os resultados de eficácia do ensaio são mostrados abaixo, na Tabela 17 e na Figura 3:

Tabela 17

Eficácia do cobimetinib em combinação com vemurafenib em pacientes com melanoma positivo para mutação BRAF^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Placebo + Vemurafenib (N = 248)	Valor de p
Sobrevivência livre de progressão (avaliada pelo investigador)			
Número de eventos (%)	143 (58%)	180 (73%)	
Progressão	131	169	
Óbito	12	11	
Mediana de PFS (meses) (IC de 95%)	12,3 (9,5; 13,4)	7,2 (5,6; 7,5)	
Taxa de risco (IC de 95%) ^b	0,56 (0,45; 0,70)		<0,001 ^d
Sobrevivência global			
Número de óbitos (%)	79 (32%)	109 (44%)	
Mediana de sobrevivência (meses) (IC de 95%) ^c	Não calculável (20,7; não calculável)	17,0 (15,0; não calculável)	-
Taxa de risco (IC de 95%) ^b	0,63 (0,47; 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Taxa de resposta objetiva			
Taxa de resposta objetiva (IC de 95%) ^c	70% (64%, 75%)	50% (44%, 56%)	< 0,001
Resposta completa	16%	10%	
Resposta parcial	54%	40%	
Mediana de duração da resposta (meses) (IC de 95%) ^c	13,0 (11,1; 16,6)	9,2 (7,5; 12,8)	-

^a Conforme detetado pelo teste **cobas** BRAF

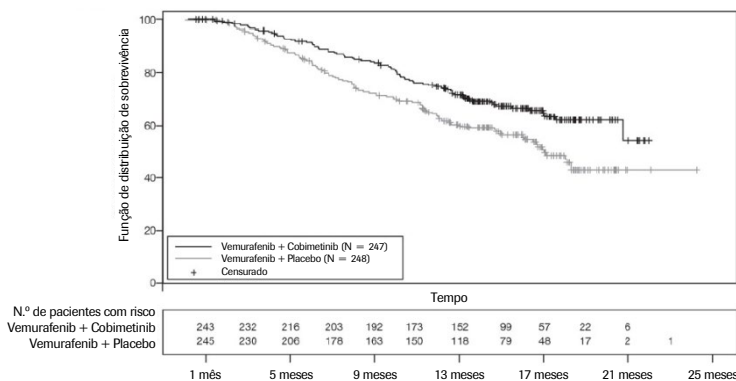
^b Estimativa da taxa de risco utilizando o modelo de Cox; uma taxa de risco < 1 favorece o cobimetinib + vemurafenib

^c Estimativa de Kaplan-Meier

^d Teste log-rank estratificado

^e Significado estatístico consoante a comparação com o alfa atribuído de 0,019 para esta análise interina

Figura 3
Curvas de Kaplan-Meier de sobrevivência global



Amostras disponíveis de tumor de pacientes aleatórios foram analisadas retrospectivamente utilizando sequenciação de nova geração (NGS) para classificação adicional das mutações BRAF como V600E ou V600K; foram obtidos resultados de teste de 81% dos pacientes aleatórios (400/495). Dos pacientes para os quais a NGS foi realizada com sucesso, 56 de 400 (14%) pacientes tinham tumores com mutações V600K do BRAF e os restantes pacientes tinham tumores com mutações V600E do BRAF. Os 56 tumores que tinham, retrospectivamente, a mutação V600K do BRAF, tinham frequências de mutação entre 5,1 e 36,6% nesta análise. Observou-se uma tendência a favor do braço cobimetinib com vemurafenib em análises exploratórias de subgrupos de PFS, SG e ORR para os subtipos de mutação V600 do BRAF em 81% dos pacientes neste ensaio em que se determinou o tipo de mutação V600 do BRAF.

II. CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIRÓIDE (CPT)

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

Para os estudos não clínicos descritos abaixo, as características dos tumores, tais como a % de conteúdo tumoral, foram avaliadas por exame patológico. A sequenciação Sanger bidirecional foi utilizada para selecionar as amostras para teste. A % de nível de mutação foi determinada utilizando a sequenciação 454 (método quantitativo de pirosequenciação massivamente paralela).

Sensibilidade analítica

Sensibilidade analítica – Limite de Detecção (LoD)

Foi avaliada a quantidade mínima de ADN de entrada que produz resultados corretos 95% das vezes, utilizando painéis de diluição preparados a partir de dois tipos de amostras:

- Misturas de amostras preparadas misturando stocks de ADN obtidos de amostras de FFPET de mutantes V600E do BRAF e amostras de FFPET de wild-type BRAF para atingir níveis de mutação específicos.
- Stocks de ADN de amostras de FFPET individuais preparadas a partir de duas amostras de FFPET de mutantes V600E do BRAF.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram sequenciadas por sequenciação 454 de modo a determinar a percentagem de mutação de cada amostra.

Sensibilidade analítica utilizando misturas de amostras

Stocks de ADN de amostras de FFPET de mutante V600E do BRAF foram misturados com stocks de ADN de amostras de FFPET de wild-type BRAF para obter uma amostra a ~10%, uma amostra a ~5% e uma amostra a nível de mutação ~2%. Após a mistura, os níveis de mutação foram verificados por sequenciação 454. Cada uma das 3 misturas de amostras com mutação V600E foi depois diluída para produzir os membros de painel especificados na Tabela 18.

Tabela 18
Preparação de membros do painel de diluição de misturas de amostras

Mistura	Mutação média (%)*	Quantidade de ADN nos membros do painel de diluição (ng/25 µl)**
Mistura a 10%	10%	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Mistura a 5%	5%	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Mistura a 2,5%	2%	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
0% (apenas wild-type)	- - -	125

* Percentagem média de mutação da mistura, testada por sequenciação 454.

** Quantidade de ADN genómico contido em cada membro do painel. 25 µl é o volume de entrada de amostra para o teste.

8 réplicas de cada membro do painel foram executadas utilizando 3 lotes do kit do teste **cobas** BRAF (n = 24/membro de painel). A Tabela 19 indica a sensibilidade de cada mistura de FFPET, determinada pela menor quantidade de ADN que originou uma taxa de “Mutation Detected” do V600E do BRAF de pelo menos 95% (linhas sombreadas).

Tabela 19
Sensibilidade do teste cobas BRAF utilizando misturas de FFPET

Mistura de FFPET	Porcentagem de mutação por sequenciação 454	Quantidade de ADN no membro do painel	Taxa de “Mutation Detected” (n = 24)
Mistura de FFPET a 10%	10%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	100%
		0,5 ng/25 µl	92%
		0,2 ng/25 µl	83%
		0,1 ng/25 µl	29%
Mistura de FFPET a 5%	5%	125 ng/25 µl	96%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	83%
		0,5 ng/25 µl	54%
		0,2 ng/25 µl	67%
		0,1 ng/25 µl	25%
Mistura de FFPET a 2,5%	2%	125 ng/25 µl	0%
		41,7 ng/25 µl	0%
		13,9 ng/25 µl	4%
		4,6 ng/25 µl	21%
		1,5 ng/25 µl	21%
		0,5 ng/25 µl	33%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%
0% (wild-type)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Este estudo demonstra que o teste **cobas** BRAF pode detetar a mutação V600E do BRAF a um nível de mutação $\geq 5\%$ utilizando a entrada padrão de 125 ng/25 µl. A capacidade do teste de detetar a mutação em níveis mais baixos de entrada de ADN demonstra que as amostras podem conter ADN degradado devido ao processo de fixação e ainda assim a mutação ser detetada. Todos os resultados obtidos da amostra wild-type BRAF eram “Mutation Not Detected”.

Sensibilidade analítica utilizando amostras de FFPET

Para confirmar a indicação de deteção de mutação de 5% em amostras de pacientes, vinte e quatro secções individuais de 5 µm de 2 amostras de FFPET com mutação V600E do BRAF contendo níveis de mutação de 6% e 11% foram processadas individualmente utilizando 3 lotes do **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit para isolar o ADN. Foram preparadas diluições em série do ADN de cada secção para produzir um conjunto de 8 membros de painel detalhados na Tabela 20.

Tabela 20
Preparação de membros do painel de diluição de amostras de FFPET

	Mutação V600E média (%)*	Quantidade de ADN nos membros do painel de diluição (ng/25 µl)
Amostra 1	6%	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Amostra 2	11%	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1

* Percentagem média de mutação da amostra, determinada por sequenciação 454

8 réplicas de cada membro do painel foram executadas utilizando 3 lotes do kit do teste **cobas** BRAF (n = 24/membro de painel). A sensibilidade de cada amostra de FFPET foi determinada pela menor quantidade de ADN que originou uma taxa de “Mutation Detected” do V600E do BRAF de pelo menos 95% (linhas sombreadas). Os resultados do estudo são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21
Sensibilidade do teste cobas BRAF utilizando amostras de FFPET

Amostra de FFPET	Percentagem de mutação por sequenciação 454	Quantidade de ADN no membro do painel	Taxa de “Mutation Detected” (n = 48)
Amostra 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	83%
		1,5 ng/25 µl	71%
		0,5 ng/25 µl	29%
		0,2 ng/25 µl	17%
		0,1 ng/25 µl	0%
Amostra 2	11%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	71%
		1,5 ng/25 µl	46%
		0,5 ng/25 µl	17%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%

O estudo demonstrou que o teste **cobas** BRAF pode detetar a mutação V600E do BRAF em amostras clínicas de FFPET reais a um nível de mutação $\geq 5\%$ utilizando a entrada padrão de 125 ng/25 µl. A capacidade do teste de detetar a mutação em níveis mais baixos de entrada de ADN demonstra que as amostras podem conter ADN degradado devido ao processo de fixação e ainda assim a mutação ser detetada.

Repetibilidade

Efetuuou-se um estudo para avaliar a repetibilidade do teste **cobas** BRAF com dois lotes de reagentes, dois operadores e quatro dias de testes, com cinco amostras de FFPET de cancro papilífero da tiróide. Essas amostras de FFPET incluíram uma gama de percentagem de conteúdo tumoral (50 a 70%) e percentagem de alelos mutantes (16 a 22%), incluindo duas amostras com mutação V600E a ~16-18% de mutação ($\sim 3 \times$ LoD). Foi obtido o resultado correto para 100% das amostras testadas (80/80). Não se observaram falsos-positivos em nenhuma das amostras WT testadas. Em resumo, o teste **cobas** BRAF foi altamente repetível em amostras com baixo conteúdo tumoral e com uma percentagem baixa de alelos mutantes, e com operadores, lotes de reagentes e dias, diferentes para os testes.

Correlação com o método de referência

Para avaliar o desempenho do teste **cobas** BRAF quando comparado com sequenciação Sanger bidirecional 2×, foram recolhidos dados de sequenciação Sanger de 159 amostras de FFPET de PTC. A análise de concordância primária entre os resultados do teste **cobas** BRAF e os resultados da sequenciação Sanger para detecção da mutação V600E é mostrada na Tabela 22 para um dos dois lotes de reagentes testados. O segundo lote produziu resultados semelhantes, exceto para uma amostra que deu um resultado “Mutation Not Detected”. A resolução por sequenciação 454 determinou que a amostra continha 1,4% de mutação e estava abaixo da sensibilidade de 5% indicada para o teste **cobas** BRAF.

Tabela 22
Resumo dos resultados do teste cobas BRAF vs. sequenciação Sanger

Teste cobas BRAF (método de teste)	Sequenciação Sanger (método de referência)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	Total
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Total	89	70	159
Concordância na percentagem de positivos (IC de 95%)	100% × 88 / 89 = 98,9% (93,9%, 99,8%)		
Concordância na percentagem de negativos (IC de 95%)	100% × 57 / 70 = 81,4% (70,8%, 88,8%)		
Concordância na percentagem geral (IC de 95%)	100% × 145 / 159 = 91,2% (85,8%, 94,7%)		

^a “Mutation Detected” indica a presença do tipo de mutação BRAF predominante, V600E (1799 T>A), conforme identificado por Sanger.

^b “Mutation Not Detected” indica a ausência do tipo de mutação BRAF predominante, V600E, conforme identificado por Sanger (ou seja, wild-type ou sem mutação, e outras mutações).

Nota: IC = (valor) intervalo de confiança.

Todas as amostras que deram resultados discordantes do teste **cobas** BRAF e da sequenciação Sanger, foram todas sujeitas a sequenciação 454 (pirosequenciação massivamente paralela quantitativa) como um segundo método de referência. A análise secundária de concordância, após resolução dos discordantes, é apresentada na Tabela 23.

Uma amostra discordante teve um resultado “Mutation Not Detected” pelo teste **cobas** BRAF e um resultado V600E por sequenciação Sanger. A sequenciação 454 deu um resultado wild-type concordante com o teste **cobas** BRAF.

Para 12 das 13 amostras discordantes com uma mutação detetada pelo teste **cobas** BRAF e um wild-type por sequenciação Sanger, a sequenciação 454 deu uma mutação V600E (frequência de alelos mutantes de 1,2% a 19%), concordante com o teste **cobas** BRAF.

A amostra discordante restante, que tinha uma mutação V600E detetada pelo teste **cobas** BRAF, foi wild-type por sequenciação Sanger e foi wild-type também por sequenciação 454. Uma investigação adicional com sequenciação 454 confirmou posteriormente que a amostra era uma mutação V600E de baixa percentagem.

Tabela 23
Resultados do teste cobas BRAF vs. sequenciação Sanger após resolução dos resultados discordantes por sequenciação 454

Teste cobas BRAF (método de teste)	Sequenciação Sanger depois de resolução de discordância por sequenciação 454		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Total
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Total	101	58	159
Concordância na percentagem de positivos (IC de 95%)	100% × 101 / 101 = 100,0% (96,3%, 100,0%)		
Concordância na percentagem de negativos (IC de 95%)	100% × 57 / 58 = 98,3% (90,9%, 99,7%)		
Concordância na percentagem geral (IC de 95%)	100% × 158 / 159 = 99,4% (96,5%, 99,9%)		

LISTA DE ALARMES DE RESULTADOS

Alarmes de resultados que podem aparecer no separador Resultados. A origem de um alarme está indicada no código do alarme conforme descrito na seguinte Tabela 24. A Tabela 25 apresenta uma lista de todos os alarmes de interpretação de resultados que são relevantes para o utilizador.

Tabela 24
Origem do alarme

Código do alarme começa por	Origem do alarme	Exemplo
M*	Vários ou outros motivos	M6
R	Interpretação do resultado	R200
Z*	Analizador	Z1

* Consultar o Manual do operador do **cobas**[®] 4800 System ou a Assistência ao utilizador do **cobas**[®] 4800 System

Tabela 25
Lista de alarmes de interpretação de resultados

Código do alarme	Gravidade	Descrição	Ação recomendada
R200	Erro	Controlo mutante inválido.	Repita a corrida. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica uma das seguintes ocorrências: <ol style="list-style-type: none">Um valor de CT observado do controlo mutante estava abaixo do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado baixo). Isto poderá ocorrer no caso de contaminação do ADN ou de um erro de algoritmo devido a um padrão de fluorescência atípico, ouUm valor de CT observado do controlo mutante estava acima do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado alto). Isto poderá ocorrer no caso de 1) preparação incorreta da mistura principal, 2) erro de pipetagem ao adicionar mistura principal de trabalho num poço de reação da microplaca, ou 3) erro de pipetagem ao adicionar controlo mutante num poço de reação da microplaca.
R201	Erro	Controlo wild-type inválido.	Repita a corrida. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica uma das seguintes ocorrências: <ol style="list-style-type: none">Um valor de CT observado do controlo wild-type estava abaixo do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado baixo). Isto poderá ocorrer no caso de contaminação do ADN ou de um erro de algoritmo devido a um padrão de fluorescência atípico, ouUm de CT elbow observado do controlo wild-type estava acima do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado alto). Isto poderá ocorrer no caso de 1) preparação incorreta da mistura principal, 2) erro de pipetagem ao adicionar mistura principal de trabalho num poço de reação da microplaca, ou 3) erro de pipetagem ao adicionar controlo wild-type num poço de reação da microplaca.
R202	Erro	Ct mutante não detetado	Repita a amostra. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica que não foi observado para a amostra um valor CT mutante. Isto poderá indicar a ausência da mutação na amostra, ou poderá indicar um ou mais dos seguintes casos: <ol style="list-style-type: none">Baixa percentagem de sequências mutantes que estão abaixo do limite de deteção do teste.Má qualidade do ADN genómico da amostra.Processamento inadequado da amostra.A presença de inibidores da PCR na amostra.Mutações raras dentro das regiões do ADN genómico cobertas pelos primers e/ou sonda de mutante.Erro de pipetagem de amostra ou ADN da amostra poderá não ter sido adicionado ao poço de reação.

Código do alarme	Gravidade	Descrição	Ação recomendada
R203	Erro	Ct wild-type não detetado.	<p>Repita a amostra. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica que não foi observado para a amostra um valor de CT wild-type. A ausência de um valor CT wild-type sugere um dos seguintes casos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Má qualidade do ADN genómico da amostra. 2. Processamento inadequado da amostra. 3. A presença de inibidores da PCR na amostra. 4. Mutações raras dentro das regiões do ADN genómico cobertas pelos primers e/ou sonda de wild-type. 5. Poderá não ter sido adicionado ADN da amostra a um ou mais poços.
R204	Erro	Ct mutante fora do intervalo.	<p>Repita a amostra. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica uma das seguintes ocorrências:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Um valor de CT mutante observado da amostra estava abaixo do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado baixo). Isto poderá ocorrer se a mistura da PCR estiver significativamente sobrecarregada com ADN genómico concentrado ou devido a um erro de algoritmo devido a um padrão de fluorescência atípico, ou 2. Um valor de CT mutante observado da amostra estava acima do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado alto). Isto poderá indicar um ou mais dos seguintes casos: <ul style="list-style-type: none"> • Baixa percentagem de sequências mutantes que estão abaixo do limite de deteção do teste. • Erro de pipetagem ao adicionar ADN da amostra ao poço de reação. • Má qualidade do ADN genómico da amostra. • Processamento inadequado da amostra. • A presença de inibidores da PCR na amostra. • Mutações raras dentro das regiões do ADN genómico cobertas pelos primers e/ou sonda de mutante.
R205	Erro	Ct wild-type fora do intervalo.	<p>Repita a amostra. Consulte o folheto informativo específico do teste. Este código de alarme indica uma das seguintes ocorrências:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Um valor de CT wild-type observado da amostra estava abaixo do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado baixo). Isto poderá ocorrer se a mistura da PCR estiver significativamente sobrecarregada com ADN genómico concentrado ou devido a um erro de algoritmo devido a um padrão de fluorescência atípico, ou 2. Um valor de CT wild-type observado da amostra estava acima do limiar estabelecido (ou seja, CT demasiado alto). Isto poderá indicar um ou mais dos seguintes casos: <ul style="list-style-type: none"> • Erro de pipetagem ao adicionar ADN da amostra ao poço de reação. • Má qualidade do ADN genómico da amostra. • Processamento inadequado da amostra. • A presença de inibidores da PCR na amostra. • Mutações raras dentro das regiões do ADN genómico cobertas pelos primers e/ou sonda de wild-type.

BIBLIOGRAFIA

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

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 10.0 08/2019	<p>Atualizadas as secções UTILIZAÇÃO PRETENDIDA e RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE.</p> <p>Adicionadas as secções Eficácia clínica do ZELBORAF® (vemurafenib) e Eficácia clínica do COTELLIC® (cobimetinib).</p> <p>Adicionadas informações sobre a estabilidade das lâminas na secção COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.</p> <p>Adicionado um enunciado sobre melanina na secção LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO.</p> <p>Adicionadas atualizações gerais de idiomas para clarificar e harmonizar com o cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test US-IVD IFU.</p> <p>Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.</p>
11/2019	<p>Correção de texto de “FFFPET” para “FFPET” e o tipo de letra do símbolo de “maior ou igual a” na página 24 para apresentação adequada em PDF.</p> <p>Atualizada a página de símbolos harmonizados.</p> <p>Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.</p>
Doc Rev. 11.0 06/2020	<p>Removidas as seguintes informações do DNA Sample Preparation kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Listas de reagentes e informação de composição • Notas e passos processuais relacionados <p>Adicionada referência às Instruções de utilização do cobas® DNA Sample Preparation Kit no início da secção Limitações do procedimento.</p> <p>Os manuais do operador e do sistema foram atualizados ao longo do documento para: “Manual do operador do cobas® 4800 System ou Assistência ao utilizador do cobas® 4800 System”.</p> <p>Foram corrigidos erros ortográficos e o texto atualizado para consistência e normalização da linguagem utilizada através do documento e para consistência com folhetos informativos dos EUA.</p> <p>Adicionados alarmes de resultados.</p> <p>Atualizada referência a International Air Transport Association.</p> <p>Atualizada a página de símbolos harmonizados, a secção de marcas comerciais e patentes e os endereços de distribuidores.</p> <p>Foi adicionado um enunciado para esclarecer que a rotulagem de segurança do produto segue essencialmente a diretiva GHS da UE.</p> <p>Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.</p>

Fabricado nos Estados Unidos



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



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marcas comerciais e patentes

COBAS, COBAS Z e AMPERASE são marcas comerciais da Roche.

Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respectivos proprietários.

A tecnologia de prevenção de contaminação na enzima AmpErase está coberta pela patente dos EUA n.º 7,687,247 de propriedade da Life Technologies e está licenciada para a Roche Molecular Systems, Inc.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.
























06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-11



Os seguintes símbolos são utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

	Software auxiliar		Código do batch
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Risco biológico
	Folha de dados de códigos de barras		Referência de catálogo
	Consulte as instruções de utilização		Apenas para avaliação do desempenho IVD
	Conteúdo suficiente para <n> testes		Limite inferior do intervalo atribuído
	Conteúdo do kit		Fabricante
	Distribuído por		Armazenar no escuro
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura
	Ficheiro de definição de teste		Prazo de validade
	Limite superior do intervalo atribuído		Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a ou a pedido de um profissional licenciado.
	Global Trade Item Number		Data do fabrico
	Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		

Apoio Técnico a Clientes EUA 1-800-526-1247