

# cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test

cobas<sup>®</sup>

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *IN VITRO*.

cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Szczegółowe informacje na temat przygotowywania próbek podano w ulotce dołączonej do zestawu cobas<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

## ZASTOSOWANIE

Podstawowe zastosowanie testu cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test to detekcja mutacji BRAF V600 w DNA wyizolowanym z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek czerniaka oraz raka brodawczakowatego tarczycy (ang. *Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) pochodzenia ludzkiego. W przypadku czerniaka jest testem pomocniczym w selekcji pacjentów, których guzy zawierają mutacje BRAF V600, w leczeniu lekiem ZELBORAF<sup>®</sup> (wemurafenib) lub lekiem COTELLIC<sup>®</sup> (kobimetynib) w skojarzeniu z lekiem ZELBORAF<sup>®</sup> (wemurafenib).

## PODSUMOWANIE ORAZ OPIS TESTU

Uaktywnianie się mutacji protoonkogenu BRAF zachodzi w przypadku wielu ludzkich nowotworów, w tym w przebiegu czerniaka złośliwego, raka jelita grubego, raka jajnika czy raka tarczycy<sup>1, 2</sup>. Mutacje BRAF zostały zidentyfikowane w 40–60% przypadków czerniaków złośliwych<sup>3</sup> oraz w 36–46% przypadków raka brodawczakowatego tarczycy<sup>4, 5</sup>. Występowanie mutacji BRAF jest powszechne także w przypadku łagodnych znamion<sup>6</sup>, co sugeruje, że tego typu mutacje zachodzą na bardzo wczesnym etapie. Odkrycie opisywanych mutacji somatycznych w genie BRAF czerniaka, PTC i innych ludzkich nowotworów okazało się pomocne w określeniu głównej roli kinazy BRAF w ścieżkach sygnałowych kontrolujących proliferację, różnicowanie i obumieranie komórek. W przypadku zdrowych komórek, gen BRAF stanowi część wysoce regulowanej ścieżki sygnałowej, która pośredniczy w oddziaływaniu receptorów czynnika wzrostu (takich jak EGFR) na gen RAS, RAF, MEK oraz ERK. Mutacje onkogenne w obrębie genu BRAF powodują zwiększenie funkcji kinaz, tworząc konstytutywnie aktywną ścieżkę RAF-MEK-ERK przy braku typowych czynników wzrostu.

Większość mutacji genu BRAF w przypadku czerniaka, PTC i innych nowotworów ludzkich zachodzi w kodonie 600<sup>7</sup>. Dominująca mutacja w kodonie 600 to mutacja V600E (GTG > GAG). Mniej powszechnie obserwowano także wiele mutacji dinukleotydowych obejmujących kodon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) i V600D (GTG > GAT)], głównie w przebiegu czerniaka i rzadko w przypadku innych nowotworów, takich jak rak jelita grubego.

Test cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test to test reakcji PCR zachodzącej w czasie rzeczywistym opracowany do wykrywania obecności mutacji V600E (T1799A). Test cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test to test diagnostyczny towarzyszący leczeniu wemurafenibem, związkiem powodującym inhibicję zmutowanej wersji V600E genu BRAF. Badania kliniczne wemurafenibu u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem wykazały, że pacjenci ze zmutowanym guzem V600E przypuszczalnie skorzystają klinicznie ze stosowania tego związku<sup>8, 9</sup>. Późniejsze badanie kliniczne kobimetynibu w skojarzeniu z wemurafenibem u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem wykazało, że pacjenci z mutacjami guza V600E lub V600K wykrywanymi za pomocą testu cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test przypuszczalnie odniosą korzyść kliniczną z tej terapii<sup>10, 11</sup>. V600K występuje w około 10–15% próbek czerniaka z mutacją BRAF V600<sup>12</sup>.

## ZASADY PROCEDURY

Test cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test (test cobas BRAF) opiera się na dwóch procesach: (1) manualnym przygotowaniu próbki w celu pozyskania genomowego DNA z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek tkanki (ang. *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue*, FFPET); (2) amplifikacji w reakcji PCR i detekcji docelowego DNA z użyciem pary starterów komplementarnych oraz dwóch sond oligonukleotydowych znakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Jedna sonda służy do detekcji naturalnie występującej sekwencji BRAF V600, natomiast druga służy do detekcji sekwencji mutacji V600E. Dostarczane są dwie kontrole zewnętrzne cyklu oznaczeń, natomiast naturalnie występujący allel służy jako wewnętrzna kontrola całego procesu.

## Przygotowanie próbek

Próbki FFPET są przetwarzane w celu wyizolowania genomowego DNA przy użyciu zestawu cobas<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit, manualnego przygotowywania próbek opartego na związaniu kwasu nukleinowego z włóknami szklanymi. Pozbawiony parafiny skrawek próbki FFPET o grubości 5 µm zostaje poddany lizie przez inkubację w podwyższonej temperaturze z proteazą i chaotropowym buforem lizującym/wiążącym, który uwalnia kwasy nukleinowe i chroni uwolniony genomowy DNA przed DNazami. W dalszej kolejności do mieszaniny, w której dokonano lizy, dodaje się izopropanol, po czym mieszaninę wiruje się i przepuszcza przez kolumnę z wkładem filtrującym, zawierającym włókna szklane. W trakcie wirowania genomowy DNA ulega związaniu na powierzchni włókien szklanych filtra. Substancje niezwiązane, takie jak sole, białka i inne zanieczyszczenia pochodzenia komórkowego, zostają usunięte w wyniku wirowania. Związane kwasy nukleinowe są przemywane i poddane elucji roztworem wodnym. Ilość genomowego DNA określa się spektrofotometrycznie i dostosowuje do ustalonego stężenia dodawanego do mieszaniny do amplifikacji i detekcji. Następnie docelowy DNA amplifikuje się i poddaje detekcji w analizatorze cobas z 480 z użyciem odczynników do amplifikacji i detekcji, dostarczanych wraz z zestawem cobas BRAF.

Rozdział Informacje dotyczące wersji dokumentu znajduje się na końcu tego dokumentu.

05952603001-11PL

1

Doc Rev. 11.0

## **Amplifikacja i detekcja metodą PCR**

### Wybór sekwencji docelowej

Test **cobas** BRAF wykorzystuje startery, które definiują sekwencję 116 par zasad ludzkiego DNA genomowego zawierającego miejsce kodonu 600 BRAF w eksonie 15. Całość genu BRAF nie ulega amplifikacji. Test **cobas** BRAF jest przeznaczony do detekcji zmiany T>A nukleotydu 1799 w genie BRAF, powodującej podstawienie waliny do kwasu glutaminowego w kodonie 600 (V600E). Swoiste dla docelowego, naturalnie występującego genu BRAF i DNA mutantu, znakowane fluorescencyjnie sondy TaqMan wiążą się odpowiednio z sekwencjami naturalnie występującymi i z sekwencjami mutantu. Sekwencje naturalnie występujące i sekwencje mutantów wykrywane są przy użyciu dedykowanego kanału optycznego dla każdej sekwencji.

### Amplifikacja sekwencji docelowej

Do amplifikacji sekwencji docelowej wykorzystywana jest polimeraza DNA *Thermus species* Z05. Mieszanina reakcyjna PCR jest najpierw podgrzewana w celu zdenaturowania genomowego DNA oraz odsłonięcia sekwencji docelowych starterów. W miarę ochładzania się mieszaniny startery wiodące i odwrotne hybrydują z docelowymi sekwencjami DNA. Polimeraza DNA Z05 w obecności jonu dwuwartościowego metalu oraz nadmiaru dezoksyrybonukleotydów (dNTP) wydłuża każdy przyłączony w wyniku hybrydacji starter i w ten sposób następuje synteza drugiej nici DNA. Proces ten kończy pierwszy cykl reakcji PCR, dostarczając dwuniciowej kopii DNA docelowego regionu zawierającego 116 par zasad genu BRAF. Proces ten powtarza się wielokrotnie, przy czym w każdym z cykli ilość docelowego DNA (amplikonu) ulega podwojeniu. Amplifikacja odbywa się wyłącznie w tym regionie genu BRAF, który zawarty jest pomiędzy parą starterów.

### Zautomatyzowana detekcja w czasie rzeczywistym

Test **cobas** BRAF wykorzystuje technologię PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). W tej reakcji każda swoista dla sekwencji docelowej sonda oligonukleotydowa jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym, służącym jako reporter, a także cząsteczką pełniącą funkcję wygaszacza absorbującego (wygaszającego) emisję fluorescencji pochodzącą z barwnika reporterowego w nienaruszonej sondzie. W trakcie każdego cyklu amplifikacji służąca do sekwencji jednoniciowego DNA w amplikonie sonda komplementarna wiąże się z nią, a następnie ulega rozszczepieniu pod wpływem polimerazy DNA Z05, wykazującej aktywność nukleazy w kierunku od końca 5' do końca 3' łańcucha. Po oddzieleniu się barwnika reporterowego od wygaszacza wskutek aktywności nukleazy można zmierzyć promieniowanie fluorescencyjne o charakterystycznej długości fali po wzbudzeniu barwnika reporterowego odpowiednim widmem światła. Dwa różne barwniki reporterowe służą do oznaczania sondy swoistej dla docelowego, naturalnie występującego genu BRAF (WT) oraz sondy mutacji BRAF V600E. Amplifikacja dwóch sekwencji genu BRAF może być wykrywana niezależnie, w jednym dołku reakcyjnym, przez pomiar fluorescencji przy dwóch charakterystycznych długościach fali w przypisanych do nich kanałach optycznych.

### Amplifikacja wybiórcza

Amplifikacja wybiórcza docelowego kwasu nukleinowego z próbki jest osiągana w teście **cobas** BRAF dzięki użyciu enzymu AmpErase (uracilo-N-glikozylaza) i trifosforanu dezoksyurydyny (dUTP)<sup>13</sup>. Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje zniszczenie nici DNA zawierających dezoksyurydynę, ale nie DNA zawierającego tymidynę. W DNA występującym w naturze nie ma dezoksyurydyny, natomiast jest ona zawsze obecna w amplikonie w związku z zastosowaniem trójfosforanu dezoksyurydyny (dUTP) jako jednego spośród trójfosforanów nukleotydów w odczynniku Reaction Mix. Dlatego dezoksyurydynę zawiera wyłącznie amplikon. Dezoksyurydyna powoduje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Zawarty w odczynniku Reaction Mix enzym AmpErase katalizuje rozkład DNA zawierającego dezoksyurydynę w miejscu reszt dezoksyurydynowych przez otwarcie łańcucha dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym przy wartościach pH oznaczających środowisko zasadowe łańcuch amplikonu DNA pęka w miejscu, w którym znajduje się dezoksyurydyna, wykluczając w ten sposób dalszą amplifikację DNA. Enzym AmpErase jest nieczynnny w temperaturze powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, dlatego też nie niszczy on amplikonu docelowego.

**ODCZYNNIKI**

<b>cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF)</b> <b>24 testów (M/N: 05985595190)</b>			
<b>Elementy zestawu</b>	<b>Skład odczynników</b>	<b>Ilość na zestaw</b>	<b>Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie<sup>a</sup></b>
<b>RXNMIX (Mieszanina reakcyjna)</b>	Bufor trycynowy Octan potasu Wodorotlenek potasu Glicerol Tween 20 EDTA 5% dimetylosulfotlenek <0,09% dNTP < 0,10% polimeraza DNA Z05 (bakteryjnej) <0,10% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) < 0,003% aptameru oligonukleotydowego 0,08% azydku sodu	3 × 0,16 ml	Brak danych
<b>MGAC (Octan magnezu)</b>	Octan magnezu 0,09% azydku sodu	3 × 0,15 ml	Brak danych
<b>BRAF OM (BRAF Oligo Mix)</b>	Bufor Tris-HCl EDTA 0,09% azydku sodu Poli-rA RNA (syntetyczny) < 0,01% startery sensowne i antysensowne BRAF < 0,01% sondy BRAF znakowanej barwnikiem fluorescencyjnym	3 × 0,13 ml	Brak danych
<b>BRAF MUT (Kontrola mutacji genu BRAF)</b>	Bufor Tris-HCl EDTA Poli-rA RNA (syntetyczny) 0,05% azydku sodu < 0,001% plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencję mutacji BRAF < 0,001% plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego naturalnie występującą sekwencję BRAF	2 × 0,13 ml	Brak danych
<b>BRAF WT (Kontrola naturalnie występującej sekwencji BRAF)</b>	Bufor Tris-HCl EDTA Poli-rA RNA (syntetyczny) 0,05% azydku sodu < 0,001% plazmidu DNA (bakteryjnego) zawierającego naturalnie występującą sekwencję BRAF	2 × 0,13 ml	Brak danych
<b>DNA SD (Rozcieńczalnik DNA próbki)</b>	Bufor Tris-HCl 0,09% azydku sodu	2 × 1 ml	Brak danych

<sup>a</sup> Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

## OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

### A. DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE *IN VITRO*.

- B. Niniejszy test jest przeznaczony do badania utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek tkanki.
- C. Nie należy pipetować za pomocą ust.
- D. Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- E. Należy unikać zakażenia odczynników: bakteryjnego i przez DNA.
- F. Należy zutylizować wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.
- G. Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- H. Nie należy mieszać odczynników pochodzących z różnych zestawów lub serii.
- I. Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- J. W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana przed przystąpieniem do ponownej pracy z próbkami i odczynnikami **cobas**<sup>®</sup> 4800.
- K. Aby zapobiec kontaminacji mastermiksów próbkami DNA, należy przeprowadzać amplifikację i detekcję w miejscu oddzielnym od obszaru wykonywania izolacji DNA. Przed przygotowaniem mastermiksów należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. W celu właściwego oczyszczenia należy dokładnie przetrzeć wszystkie powierzchnie, włącznie ze statywami i pipetorami, 0,5% roztworem podchlorynu sodu\*, a następnie 70% roztworem etanolu.  
**\* UWAGA: dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.**
- L. Z próbkami należy obchodzić się tak, jak z materiałem zakaźnym, stosując laboratoryjne procedury bezpieczeństwa, takie jak określone w dokumentach *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>14</sup> oraz w dokumencie M29-A4 CLSI<sup>15</sup>.
- M. Odczynniki **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** i **DNA SD** zawierają azyd sodu. Azyd sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwanie roztworów zawierających azyd sodu do zlewów laboratoryjnych, należy spłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydów.
- N. Podczas pracy z jakikolwiek odczynnikami należy używać osłony oczu oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce tego kontaktu należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.
- O. Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- P. Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Q. Do czyszczenia analizatora **cobas z 480** nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacza). Czyszczenie analizatora **cobas z 480** należy przeprowadzać zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku operatora systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**<sup>®</sup> 4800 System.
- R. Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka skażenia, dotyczące analizatora **cobas z 480** można znaleźć w podręczniku operatora systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**<sup>®</sup> 4800 System.
- S. Zaleca się używanie jałowych jednorazowych pipet oraz końcówek pipet wolnych od DNazy.

### WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- A. Nie należy zamrażać odczynników.
- B. Odczynniki **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF OM**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** i **DNA SD** należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Po otwarciu odczynniki zachowują stabilność do 4-krotnego użycia w ciągu 60 dni albo do daty ważności, zależnie od tego, który termin wypada wcześniej.
- C. Odczynnik **BRAF OM** i mastermiks (przygotowany przez dodanie odczynnika **BRAF OM** i **MGAC** do odczynnika **RXNMIX**) należy chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło.
- D. Mastermiks (przygotowany przez dodanie odczynnika **BRAF OM** i **MGAC** do odczynnika **RXNMIX**) należy przechowywać w temperaturze 2–8°C w zaciemnionym miejscu. Przygotowane próbki i kontrole należy dodać do mastermiksów w ciągu 1 godziny od jego przygotowania.

- E. Przetworzone próbki (wyizolowany DNA) zachowują stabilność maksymalnie przez 24 godziny w temperaturze od 15°C do 30°C, maksymalnie przez 14 dni w temperaturze od 2°C do 8°C, maksymalnie przez 60 dni w temperaturze od –15°C do –25°C lub po przejściu 3 cykli zamrażania i rozmrażania przy przechowywaniu w temperaturze od –15°C do –25°C. Wyizolowany DNA powinien zostać poddany amplifikacji podczas okresu przechowywania zalecanego w danych warunkach lub przed upłynięciem daty ważności zestawu **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit użytego do wyizolowania DNA w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.
- F. Amplifikacja musi się rozpocząć w ciągu 1 godziny od czasu dodania przygotowanych próbek badanych i kontrolnych do mastermiks (przygotowanego przez dodanie odczynnika **BRAF OM** i **MGAC** do odczynnika **RXNMIX**).

## DOSTARCZONE MATERIAŁY

**cobas**<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test  
(M/N: 05985595190)

**BRAF**

**24 testy**

### **RXNMIX**

(Mieszanina reakcyjna) (korek z bezbarwnym przyciskiem)

### **MGAC**

(Octan magnezu) (korek z żółtym przyciskiem)

### **BRAF OM**

(Odczynnik BRAF Oligo Mix) (czarny korek z białym przyciskiem)

### **BRAF MUT**

(Kontrola mutacji BRAF) (korek z czerwonym przyciskiem)

### **BRAF WT**

(Kontrola naturalnie występującej sekwencji BRAF) (korek z niebieskim przyciskiem)

### **DNA SD**

(DNA rozcieńczalnik próbki) (korek z fioletowym przyciskiem)

## MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190)
- Płytki mikrodołkowe system **cobas**<sup>®</sup> 4800 System (płytki AD) i folia uszczelniająca (Roche M/N 05232724001)
- Pipetory zmiennopojemnościowe\*: (pojemność 10 µl, 20 µl, 200 µl i 1000 µl) z barierą aerozolową lub końcówki z przesunięciem dodatnim wolne od DNazy
- Probówki do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem (jałowe o pojemności 1,5 ml, wolne od RNaz/DNazy, o czystości do PCR)
- Spektrofotometr do pomiaru stężenia DNA\*\*
- Mieszadło wibracyjne\*\*
- Statywy do probówek do mikrowirówki
- Rękawice jednorazowe bezpudrowe
- Zamrażarka umożliwiająca przechowywanie w temperaturze od –25°C do –15°C

\* Pipetory powinny być konserwowane zgodnie z instrukcją producenta, a ich dokładność powinna mieścić się w granicach 3% podanej objętości. W sytuacjach określonych w dokumentacji należy używać wolnych od DNazy końcówek z barierą aerozolową lub przesunięciem dodatnim, aby zapobiec degradacji próbki i kontaminacji krzyżowej.

\*\* Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

## Urządzenia i oprogramowanie

- Analizator **cobas z 480**
- Jednostka sterująca systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 SR2 System z obrazem systemu Windows XP
- Oprogramowanie systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 SR2 System w wersji 2.0 lub nowsze
- Pakiet oprogramowania do analizy genu BRAF w wersji 1.0 lub nowszy
- Czytnik kodów kreskowych (Roche M/N: 05339910001)
- Drukarka HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

## POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

**UWAGA:** ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

### A. Pobieranie próbek

Próbki FFPET zostały zatwierdzone do wykorzystania w teście **cobas** BRAF.

### B. Transport próbek

Próbki FFPET można transportować w temperaturze 15–30°C. Próbki FFPET muszą być transportowane zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi, dotyczącymi transportu czynników zakaźnych<sup>16</sup>.

### C. Przechowywanie próbek

Stabilność próbek FFPET przechowywanych w temperaturze 15–30°C potwierdzono przez okres do 12 miesięcy od daty pobrania. Skrawki FFPET o grubości 5 µm, umieszczone na szkiełkach, można przechowywać w temperaturze 15–30°C przez okres do 60 dni.

## INSTRUKCJA UŻYTKOWANIA

**UWAGA:** wszystkie odczynniki z wyjątkiem odczynników *RXNMIX*, *MGAC* i *BRAF OM* muszą przed użyciem zostać doprowadzone do temperatury otoczenia. Odczynniki *RXN MIX*, *MGAC* i *BRAF OM* można pobierać bezpośrednio z temperatury przechowywania 2–8°C w celu przygotowania mastermiks.

**UWAGA:** w teście *cobas BRAF Test* można wykorzystywać wyłącznie skrawki FFPET czerniaka i PTC o grubości 5 µm, zawierające co najmniej 50% komórek nowotworowych. Każdą próbkę zawierającą mniej niż 50% komórek nowotworowych należy po pozabawieniu jej parafiny przeciąć makroskopowo.

**UWAGA:** szczegółowe wskazówki dotyczące obsługi analizatora *cobas* z 480 zamieszczono w podręczniku operatora systemu *cobas*® 4800 System lub podręczniku użytkownika *cobas*® 4800 System.

### Wielkość przebiegu

Zestaw **cobas** BRAF jest przeznaczony do przetwarzania od minimum 3 próbek plus kontrole do maksimum 24 próbek plus kontrole. Istnieje możliwość przetwarzania jednocześnie mniej niż 3 próbek oraz kontroli, może to jednak spowodować niewystarczającą objętość odczynnika do przetworzenia 24 próbek oraz kontroli w zestawie. Test **cobas** BRAF zawiera odczynniki wystarczające na 8 przebiegów z użyciem 3 próbek oraz kontroli. Do przeprowadzenia każdego przebiegu konieczne jest jedno powtórzenie kontroli **cobas** BRAF Test Mutant Control [**BRAF MUT**] i jedno powtórzenie kontroli **cobas** BRAF Test Wild-Type Control [**BRAF WT**] (patrz część „Kontrola jakości”).

### Przebieg pracy

**UWAGA:** test *cobas BRAF* można zastosować do 24 próbek w jednym przebiegu.

**UWAGA:** aby maksymalnie wykorzystać odczynnik, przebieg powinien zawierać co najmniej trzy (3) próbki pacjenta oraz kontrole.

### Izolacja DNA

DNA izoluje się od próbek FFPET za pomocą zestawu **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

### Przecięcie makroskopowe

Jeżeli próbka zawiera poniżej 50% tkanki guza z danego obszaru, próbkę należy przeciąć makroskopowo w ramach przygotowywania próbki.

### Ocena ilościowa stężenia DNA

**UWAGA:** pomiar stężenia DNA należy przeprowadzać natychmiast po zakończeniu procedury izolacji DNA i przed odłożeniem materiału do przechowywania.

- Przed rozpoczęciem oceny ilościowej mieszać każdy roztwór podstawowy DNA na mieszadle wibracyjnym przez 5 sekund.
- Przeprowadzić ocenę ilościową stężenia DNA za pomocą spektrofotometru zgodnie z protokołem postępowania, podanym przez producenta urządzenia. Jako próby ślepej do urządzenia użyć odczynnika **DNA EB** dostarczonego w zestawie **cobas**® DNA Sample Preparation Kit. Należy obliczyć średnią z 2 zgodnych odczytów. Wyniki dwóch pomiarów powinny mieścić się w granicach ±10% każdego z nich przy odczytach stężenia DNA ≥ 20,0 ng/µl. W przypadku odczytów stężenia DNA < 20,0 ng/µl wyniki dwóch pomiarów powinny mieścić się w granicach ±2,0 ng/µl.
- Stężenie roztworu podstawowego DNA musi wynosić ≥ 5 ng/µl, aby przeprowadzenie testu **cobas** BRAF było możliwe.

**UWAGA:** aby można było przeprowadzić test cobas BRAF, każdy roztwór podstawowy DNA musi mieć minimalne stężenie 5 ng/μl. Jeżeli stężenie roztworu podstawowego DNA nie przekracza 5 ng/μl, należy powtórzyć procedury pozabawiania próbek parafiny, izolacji DNA i oceny ilościowej stężenia DNA z użyciem dwóch skrawków FFPE tej próbki o grubości 5 μm. W przypadku próbek osadzonych na szkiełkach po pozabawieniu ich parafiny należy połączyć tkankę z obu skrawków w jednej próbówce, zanurzyć tkankę w odczynnikach TLB i PK z zestawu cobas® DNA Sample Preparation Kit, a następnie przeprowadzić izolację oraz ocenę ilościową stężenia DNA. W przypadku próbek nieosadzonych na szkiełkach, należy połączyć tkankę z obu skrawków w jednej próbówce, odparafinować, a następnie przeprowadzić izolację DNA i ocenę ilościową. Jeżeli stężenie roztworu podstawowego DNA nadal jest < 5 ng/μl, należy zwrócić się do ośrodka klinicznego, zlecającego wykonanie badania, o przysłanie kolejnej próbki FFPE.

**UWAGA:** przetworzone próbki (wyizolowany DNA) zachowują stabilność maksymalnie przez 24 godziny w temperaturze od 15°C do 30°C, maksymalnie przez 14 dni w temperaturze od 2°C do 8°C, maksymalnie przez 60 dni w temperaturze od -15°C do -25°C lub po przejściu 3 cykli zamrażania i rozmrażania przy przechowywaniu w temperaturze od -15°C do -25°C. Wyizolowany DNA powinien zostać poddany amplifikacji podczas okresu przechowywania zalecanego w danych warunkach lub przed upłynięciem daty ważności zestawu cobas® DNA Sample Preparation Kit użytego do wyizolowania DNA w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.

## AMPLIFIKACJA I DETEKcja

**UWAGA:** aby zapobiec kontaminacji mastermiksów próbkami DNA, należy przeprowadzać amplifikację i detekcję w miejscu oddzielnym od obszaru wykonywania izolacji DNA. Przed przygotowaniem mastermiksów należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. W celu właściwego oczyszczenia należy dokładnie przetrzeć wszystkie powierzchnie, włącznie ze statywami i pipetorami, 0,5% roztworem podchlorynu sodu, a następnie 70% roztworem etanolu. dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

### Konfigurowanie aparatu

Wskazówki dotyczące konfigurowania analizatora cobas z 480 zamieszczono w podręczniku operatora systemu cobas® 4800 System lub podręczniku użytkownika cobas® 4800 System.

### Konfiguracja zlecenia testu

Zapoznaj się z podręcznikiem użytkownika systemu cobas® 4800 lub podręcznikiem użytkownika systemu cobas® 4800 w celu uzyskania instrukcji dotyczących etapów procedury testu cobas BRAF.

### Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbki:

Dla jednej próbki przeprowadzany jest tylko jeden cykl amplifikacji/detekcji z wykorzystaniem 25 μl z 5 ng/μl rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA (w sumie 125 ng). Instrukcje poniżej opisują, w jaki sposób przygotować minimum 35 μl rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA o stężeniu 5 ng/μl w zależności od początkowego stężenia DNA. Ma to na celu zapewnienie, że do badania każdej próbki zostanie użyta objętość co najmniej 5 μl roztworu podstawowego DNA, aby zapobiec zmienności, która może wystąpić podczas pipetowania mniejszych objętości próbki.

### Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA próbki w przypadku stężeń od 5 ng/μl do 35 ng/μl

**UWAGA:** roztwory podstawowe DNA, pochodzące z próbek, należy rozcieńczać bezpośrednio przed amplifikacją i detekcją.

**UWAGA:** dla jednej próbki przeprowadzany jest tylko jeden cykl amplifikacji/detekcji z wykorzystaniem 25 μl z 5 ng/μl rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA (w sumie 125 ng).

- A. Dla każdej próbki należy określić wymaganą ilość roztworu podstawowego DNA za pomocą następującego wzoru:  
Wymagana objętość roztworu podstawowego DNA =  $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{stężenie roztworu podstawowego DNA w ng}/\mu\text{l}$
- B. Dla każdej próbki należy określić wymaganą ilość rozcieńczalnika do próbek DNA (**DNA SD**) za pomocą następującego wzoru:  
Wymagana objętość rozcieńczalnika DNA SD w μl =  $(35 \mu\text{l} - \text{wymagana objętość roztworu podstawowego DNA w } \mu\text{l})$   
Przykład:  
Stężenie roztworu podstawowego DNA = 21 ng/μl  
A. Wymagana objętość roztworu podstawowego DNA =  $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 21 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8,3 \mu\text{l}$   
B. Wymagana objętość rozcieńczalnika DNA SD w μl =  $(35 \mu\text{l} - 8,3 \mu\text{l}) = 26,7 \mu\text{l}$

## Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA próbki w przypadku stężeń > 35 ng/μl

**UWAGA: roztwory podstawowe DNA, pochodzące z próbek, należy rozcieńczać bezpośrednio przed amplifikacją i detekcją.**

**UWAGA: dla jednej próbki przeprowadzany jest tylko jeden cykl amplifikacji/detekcji z wykorzystaniem 25 μl z 5 ng/μl rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA (w sumie 125 ng).**

- A. W przypadku stężeń roztworu podstawowego DNA > 35 ng/μl do obliczania ilości odczynnika DNA Rozcieńczalnik próbki (**DNA SD**), wymaganej do przygotowania co najmniej 35 μl rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA, należy użyć zamieszczonego poniżej wzoru. Ma to na celu zapewnienie, że do badania każdej próbki zostanie użyta objętość co najmniej 5 μl roztworu podstawowego DNA.

Wymagana obj. DNA SD w μl = [(5 μl roztworu podstawowego DNA × stęż. roztworu podstawowego DNA w ng/μl) ÷ 5 ng/μl] – 5 μl

- B. Użyć obliczonej objętości odczynnika **DNA SD** do rozcieńczenia 5 μl roztworu podstawowego DNA.

Przykład:

Stężenie roztworu podstawowego DNA = 42 ng/μl

A. Wymagana obj. DNA SD w μl = [(5 μl × 42 ng/μl) ÷ 5 ng/μl] – 5 μl = 37 μl

B. Użyć obliczonej objętości odczynnika **DNA SD** do rozcieńczenia 5 μl roztworu podstawowego DNA.

## Rozcieńczanie próbek

- A. Przygotować odpowiednią ilość probówek do mikrowirówki o pojemności 1,5 ml na rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA z próbki, oznaczając je odpowiednimi informacjami identyfikacyjnymi w obszarze dodawania próbek.
- B. Za pomocą pipetora z końcówką zabezpieczoną przed powstawaniem aerozolu przenieść pipetą obliczoną objętość rozcieńczalnika próbek DNA (**DNA SD**) do każdej oznaczonej probówki z próbką.
- C. Mieszać każdy roztwór podstawowy DNA z próbki w mieszadle wibracyjnym przez 10 sekund.
- D. Za pomocą pipetora zabezpieczonego przed powstawaniem aerozolu delikatnie przenieść pipetą obliczoną objętość roztworu podstawowego DNA każdej próbki do właściwie oznaczonej probówki zawierającej rozcieńczalnik próbki (**DNA SD**). Do każdej próbki należy użyć nowej pipety.
- E. Zamknąć zatyczką i mieszać każdy rozcieńczony roztwór podstawowy DNA z próbki w mieszadle wibracyjnym przez 10 sekund.
- F. Zmienić rękawiczki.

## Przygotowanie mastermiks (MMX)

**UWAGA: odczynnik BRAF Oligo Mix i mastermiks MMX są wrażliwe na światło. Wszystkie otwarte mieszaniny odczynników BRAF OM i mastermiks MMX należy chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło.**

- A. Obliczyć wymaganą objętość odczynnika **RXNMIX** za pomocą następującego wzoru:

Wymagana objętość odczynnika **RXNMIX** = (liczba próbek + 2 kontrole + 1) × 10 μl

- B. Obliczyć wymaganą objętość odczynnika **BRAF OM** za pomocą następującego wzoru:

Wymagana objętość odczynnika **BRAF OM** = (liczba próbek + 2 kontrole + 1) × 8 μl

- C. Obliczyć wymaganą objętość odczynnika **MGAC** za pomocą następującego wzoru:

Wymagana objętość odczynnika **MGAC** = (liczba próbek + 2 kontrole + 1) × 7 μl

Posługując się Tabelą 1, można określić objętości każdego odczynnika, potrzebne do przygotowania mastermiks MMX, na podstawie liczby próbek włączonych do przebiegu.

**Tabela 1**

		Objętości odczynników potrzebne do przygotowania odczynnika roboczego MMX									
		Liczba próbek*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>RXN MIX</b>	<b>10 μl</b>	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
<b>BRAF OM</b>	<b>8 μl</b>	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
<b>MGAC</b>	<b>7 μl</b>	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
<b>Całkowita obj. (μl)</b>		<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>175</b>	<b>200</b>	<b>225</b>	<b>250</b>	<b>275</b>	<b>300</b>	<b>325</b>

\* Liczba próbek + 2 kontrole + 1

- D. Wyjąć odpowiednią ilość fiolek odczynników **RXNMIX**, **BRAF OM** i **MGAC** z miejsca przechowywania w temperaturze 2–8°C. Przed użyciem każdego odczynnika mieszać go przez 5 sekund na mieszadle wibracyjnym, aby zgromadzić płyn na dnie probówki. Oznakować jałową probówkę do mikrowirówki, przeznaczoną na mastermiks (MMX).
- E. Dodać obliczoną objętość odczynnika **RXNMIX** do oznakowanej probówki przeznaczonej na odczynnik MMX.

- F. Dodać obliczoną objętość odczynnika **BRAF OM** do oznakowanej próbki przeznaczanej na odczynnik MMX.
- G. Dodać obliczoną objętość odczynnika **MGAC** do oznakowanej próbki przeznaczanej na odczynnik MMX.
- H. Mieszać próbkę na mieszadle wibracyjnym przez 5 sekund, aby zapewnić odpowiednie zmieszanie roztworów.

**UWAGA: należy używać wyłącznie płytki mikrodołkowej (płytki AD) systemu cobas® 4800 System oraz odpowiedniej folii uszczelniającej (Roche M/N: 05232724001).**

- I. Ostrożnie dodać 25 µl mastermiksru MMX do każdego dołka reakcyjnego płytki AD, potrzebnego do przeprowadzenia przebiegu. Nie można dopuścić do tego, aby końcówka pipety dotknęła płytki poza obrębem dołka.

#### Dodawanie kontroli i próbek

- A. Dodać 25 µl kontroli **BRAF MUT** do dołka **A01** płytki AD i dobrze wymieszać za pomocą pipetora, aspirując i dozując kontrolę w obrębie dołka co najmniej dwukrotnie.
- B. Za pomocą nowej końcówki pipety dodać 25 µl kontroli **BRAF WT** do dołka **B01** płytki AD i dobrze zmieszać za pomocą pipetora, aspirując i dozując kontrolę w obrębie dołka co najmniej dwukrotnie.

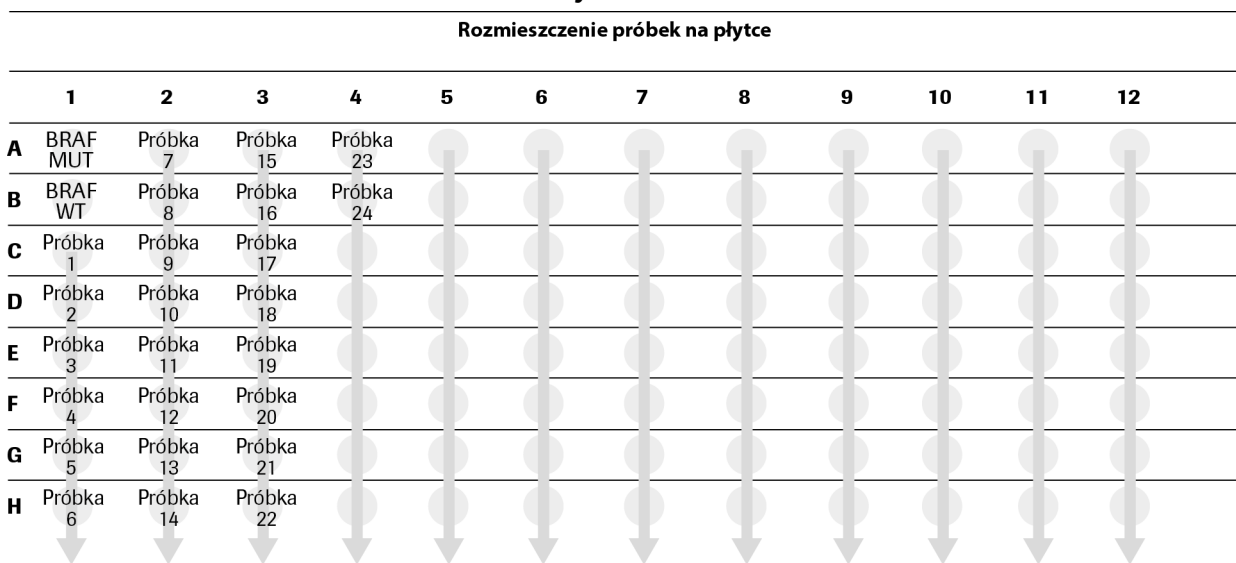
**UWAGA: każdy przebieg musi obejmować zarówno kontrolę BRAF MUT w pozycji A01, jak i kontrolę BRAF WT w pozycji B01. W przeciwnym razie przebieg zostanie unieważniony przez analizator cobas z 480.**

**UWAGA: należy zmieniać rękawice zgodnie z potrzebami, aby chronić próbki przed wzajemną kontaminacją zawartym w nich materiałem oraz chronić próbki do reakcji PCR przed kontaminacją na ich zewnętrznych powierzchniach.**

- C. Za pomocą pipetora z końcówką zabezpieczającą przed powstawaniem aerozolu dodać 25 µl rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA próbki do odpowiedniego dołka zawierającego mastermiks MMX, rozpoczynając od pozycji **C01** na płytce AD i postępując zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunek 1, poniżej. Zmieszać mieszaninę reakcyjną za pomocą pipetora, aspirując i podając mieszaninę w obrębie dołka co najmniej dwukrotnie. Upewnić się, że cały płyn zebrał się na dnie dołka.

**UWAGA: DNA próbki i kontrole należy dodać do płytki AD w ciągu 1 godziny od przygotowania mastermiksru (MMX).**

**Rysunek 1**



- D. Kontynuować, aż wszystkie badane próbki zostaną dodane do płytki AD.
- E. Przykryć płytkę AD folią do zaklejania (dostarczoną wraz z płytkami). Do zapewnienia szczelnego przytwierdzenia folii do płytki AD użyć aplikatora folii.
- F. Przed rozpoczęciem reakcji amplifikacji i detekcji potwierdzić, że cały płyn zebrał się na dnie każdego z dołków.

**UWAGA: amplifikacja i detekcja powinny rozpocząć się w ciągu 1 godziny od dodania roztworu DNA i kontroli do mastermiksru MMX.**

#### Rozpoczęcie reakcji PCR

Szczegółowe wskazówki dotyczące etapów przebiegu pracy przy wykonywaniu badań genu kodującego BRAF zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

## Interpretacja wyników

**UWAGA: cały przebieg i validację próbek przeprowadza oprogramowanie cobas® 4800 BRAF AP.**

**UWAGA: ważny przebieg może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki próbek.**

W przypadku ważnego przebiegu wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 2.

**Tabela 2**  
**Interpretacja wyników testu**

<b>Wynik testu cobas BRAF</b>	<b>Interpretacja</b>
Mutation Detected	Wykryto mutację V600 w obrębie kodonu 600 genu BRAF w eksonie 15
Mutation Not Detected lub No Mutation Detected*	Nie wykryto mutacji V600 w obrębie kodonu 600 genu BRAF w eksonie 15
Invalid	Wynik testu jest nieważny. Powtórzyć test próbek z nieważnymi wynikami, postępując zgodnie z instrukcją przedstawioną poniżej, w rozdziale <b>Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami.</b>
Failed	Przebieg nie powiódł się wskutek awarii sprzętu lub oprogramowania.

\* Wynik „Mutation Not Detected” lub „No Mutation Detected” nie wyklucza obecności mutacji w kodonie 600 genu BRAF, ponieważ wyniki zależą od liczby kopii sekwencji mutanta obecnych w próbce, a na to może mieć wpływ integralność próbki, ilość izolowanego DNA oraz obecność substancji zakłócających.

### Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami

A. Powtórzyć rozcieńczenie roztworu podstawowego DNA z próbki, która dała wynik nieważny, rozpoczynając od procedur: **Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbki i Rozcieńczanie próbki**, opisanych w rozdziale **AMPLIFIKACJA I DETEKCJA**.

**Uwaga: jeżeli nie pozostała wystarczająca objętość roztworu podstawowego DNA próbki do wykonania nowego rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, należy uzyskać nowy skrawek tkanki o grubości 5 µm i ponownie wyizolować DNA za pomocą zestawu cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), a następnie przejść do punktu B poniżej.**

B. Po wykonaniu rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA do 5 ng/µl w sposób opisany w rozdziale **Rozcieńczanie próbki**, wykonać dodatkowe rozcieńczenie w stosunku 1:2, pobierając 20 µl rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA i dodając 20 µl rozcieńczalnika próbki DNA (**DNA SD**).

C. Kontynuować postępowanie opisane w rozdziale **Przygotowanie mastermiks (MMX)** oraz dalszą część procedury amplifikacji i detekcji.

**Uwaga: jeśli wynik dla danej próbki pozostaje nieważny po ponownym testowaniu przy rozcieńczeniu 1:2, należy powtórzyć całą procedurę oznaczania dla tej próbki, rozpoczynając od izolacji DNA za pomocą testu cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) z wykorzystaniem nowego skrawka FFPET o grubości 5 µm. Do amplifikacji i detekcji powinno się stosować standardową objętość 25 µl DNA w stężeniu 5 ng/µl (bez dalszego rozcieńczania).**

## KONTROLA JAKOŚCI

Każdy przebieg obejmuje kontrolę mutacji **cobas BRAF Test (BRAF MUT)** oraz kontrolę sekwencji naturalnie występującej (**BRAF WT**). Przebieg jest ważny pod warunkiem, że zarówno status kontroli **BRAF MUT** znajdującej się w dołku (**A01**), jak i kontroli **BRAF WT** w dołku (**B01**) są ważne. Jeśli kontrola **BRAF MUT** lub **BRAF WT** jest nieważna, konieczne jest powtórzenie przebiegu. Należy wówczas przygotować świeże rozcieńczenie roztworu podstawowego DNA, wyizolowanego uprzednio z próbki, aby skonfigurować nową płytkę AD wraz z kontrolami w celu przeprowadzenia amplifikacji i detekcji.

### Kontrola mutacji genu BRAF

Wynik kontroli **BRAF MUT** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **BRAF MUT** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

### Kontrola naturalnie występującej sekwencji BRAF

Wynik kontroli **BRAF WT** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **BRAF WT** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

## ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE PROCEDURY

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość analityczną testów opartych na PCR należy przedsięwziąć wyjątkową ostrożność, używając odczynników oraz mieszanin do amplifikacji, aby zapobiec kontaminacji.

## OGRANICZENIA METODY

1. Do badań należy używać wyłącznie określonych rodzajów próbek. Test **cobas** BRAF został zwalidowany wyłącznie do badania próbek FFPET czerniaka i PTC.
2. Test **cobas** BRAF został zwalidowany wyłącznie przy użyciu zestawu do przygotowywania próbek **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190) w celu ekstrakcji genomowego DNA.
3. Detekcja mutacji zależy od liczby kopii obecnych w próbce, na którą wpływać może integralność próbki, ilość wyizolowanego DNA i obecność substancji zakłócających detekcję.
4. Wiarygodność wyników zależy od dostatecznego utrwalenia próbki, jej transportu, przechowywania i przetwarzania. Należy przestrzegać procedur opisanych w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania testu, oraz w Podręczniku użytkownika systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 lub podręczniku użytkownika systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800.
5. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej testu **cobas** BRAF enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak dla uniknięcia zanieczyszczenia odczynników konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania testu.
6. Niniejszego wyrobu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemu **cobas**<sup>®</sup> 4800 System.
7. Do użycia z tym produktem został zatwierdzony wyłącznie system **cobas**<sup>®</sup> 4800 System. Produkt nie został zatwierdzony z żadnym innym systemem do PCR.
8. Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących pomiędzy nimi różnic jakościowych.
9. Wpływ innych możliwych zmiennych, takich jak te związane z utrwaleniem próbki, nie został zbadany.
10. Mutacje i zmienności w obrębie regionów genomowego DNA tworzących gen kodujący BRAF, z którymi wiążą się startery lub sondy używane w teście **cobas** BRAF, chociaż rzadkie, mogą spowodować brak amplifikacji allelu BRAF V600 lub wykrycia mutacji w kodonie 600.
11. Obecność inhibitorów PCR może prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych lub nieważnych.
12. Melanina jest znanym inhibitorem reakcji PCR. Zestaw do przygotowywania próbek DNA w trakcie ekstrakcji usuwa melaninę z próbki; jednak melanina w próbce nadal może powodować nieważne wyniki. Jeżeli podejrzewa się inhibicję spowodowaną melaniną, sugerowane jest powtórzenie badania przy użyciu rozcieńczenia 1:2, zgodnie z opisem w części „Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami”.
13. Test **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test wykazuje ograniczoną reaktywność krzyżową w przypadku próbek zawierających mutacje inne niż V600E (V600K, V600D i V600E2). Szczegółowe informacje można znaleźć w rozdziale „Czerniak — Ocena działania w badaniach nieklinicznych”.
14. Próbki FFPET zawierające zdegradowany DNA mogą wpływać na zdolność testu do wykrycia mutacji.
15. Test **cobas** 4800 BRAF Mutation Test jest testem jakościowym. Test nie jest przeznaczony do ilościowych pomiarów mutacji.

## I. CZERNIAK

### OCENA SKUTECZNOŚCI W BADANIACH NIEKLINICZNYCH

W przypadku opisanych niżej badań nieklinicznych za pomocą badania anatomopatologicznego, oceny zawartości melaniny za pomocą badania anatomopatologicznego i wewnętrznego oznaczenia melaniny oceniano procentową zawartość tkanki guza. Do selekcji próbek przeznaczonych do badania użyto dwukierunkowego sekwencjonowania metodą Sangera. Poziom % mutacji oznaczono za pomocą sekwencjonowania metodą 454 (metoda ilościowego pyrosequencjonowania równoległego).

#### Czułość analityczna

##### **Czułość analityczna — granica wykrywalności (ang. Limit of Detection, LoD)**

Za pomocą paneli rozcieńczeń przygotowanych z trzech rodzajów próbek oceniono minimalną ilość wejściowego DNA, która daje ważne wyniki w 95% przypadków:

- Mieszaniny próbek przygotowane przez zmieszanie roztworów podstawowych DNA otrzymanych z próbek FFPET mutacji BRAF V600E oraz próbek FFPET naturalnie występującego genu BRAF w celu uzyskania określonych poziomów mutacji.
- Pojedyncze roztwory podstawowe DNA FFPET przygotowane z trzech próbek FFPET mutantą BRAF V600E.
- Mieszanina linii komórkowych przygotowana poprzez zmieszanie roztworów podstawowych DNA uzyskanych z linii komórkowej mutacji BRAF V600E oraz z linii komórkowej naturalnie występującego genu BRAF.

Wszystkie próbki wykorzystane w tym badaniu zostały poddane procesowi oznaczenia sekwencji przez sekwencjonowanie metodą 454 w celu określenia udziału procentowego mutacji każdej z próbek.

**Czułość analityczna, badana z użyciem mieszanin próbek**

Roztwór podstawowy DNA z próbek FFPET zawierających mutację BRAF V600E został zmieszany z roztworami podstawowymi DNA próbek FFPET zawierającymi naturalnie występujący gen BRAF w celu uzyskania jednej próbki o poziomie mutacji ~10%, trzech próbek o poziomie mutacji ~5% i jednej próbki o poziomie mutacji ~3%. Zbadano także jedną próbkę naturalnie występującego genu BRAF. Po zmieszaniu poziomy mutacji zostały poddane weryfikacji przez sekwencjonowanie metodą 454. Każda z pięciu mieszanin próbek zawierających mutację V600E (a nie próbkę zawierającą naturalnie występującą sekwencję) została następnie rozcieńczona, dając elementy paneli, które wyszczególniono w Tabeli 3.

**Tabela 3**  
**Przygotowanie elementów panelu rozcieńczeń otrzymanych z mieszanin próbek**

Mieszanina	Średni udział % mutacji*	Ilość DNA w elementach panelu rozcieńczeń (ng/25 µl)**
10-procentowa mieszanina	9% (n = 6)	125, 62,5, 31,3
5-procentowa mieszanina 1	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5-procentowa mieszanina 2	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5-procentowa mieszanina 3	6% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
2,5-procentowa mieszanina	3% (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0% (tylko naturalnie występujące sekwencje)	- - -	125

\* Średni udział procentowy mutacji w mieszaninie, zbadany przez sekwencjonowanie metodą 454.

\*\* Ilość genomowego DNA zawartego w każdym elemencie panelu. 25 µl to wejściowa dla testu objętość próbki.

Wykonano 8 powtórzeń każdego elementu panelu z użyciem każdej z 3 serii zestawu **cobas** BRAF (n = 24/elementu panelu). Tabela 4 przedstawia czułość dla każdej z mieszanin FFPET, określoną na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dotyczących mutacji BRAF V600E, wynoszący co najmniej 95% (szare wiersze).

**Tabela 4**  
**Czułość analityczna testu cobas BRAF badana z użyciem mieszanin próbek FFPET**

Mieszanina próbek FFPET	Udział procentowy mutacji na podstawie sekwencjonowania metodą 454	Ilość DNA w elemencie panelu	Odsetek wyników „Mutation Detected” (n = 24)
10-procentowa mieszanina próbek FFPET	9%	125 ng/25 µl	100%
		62,5 ng/25 µl	100%
		31,3 ng/25 µl	100%
5-procentowa mieszanina 1 próbek FFPET	5%	125 ng/25 µl	96%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	75%
		0,6 ng/25 µl	88%
		0,3 ng/25 µl	71%
5-procentowa mieszanina 2 próbek FFPET	5%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	92%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	96%
		0,6 ng/25 µl	58%
		0,3 ng/25 µl	50%
5-procentowa mieszanina 3 próbek FFPET	6%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	100%
		0,6 ng/25 µl	96%
		0,3 ng/25 µl	71%
2,5-procentowa mieszanina próbek FFPET	3%	125 ng/25 µl	0%
		62,5 ng/25 µl	4%
		31,3 ng/25 µl	4%
0% (naturalnie występujące sekwencje)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Wyniki tego badania wykazują, że test **cobas** BRAF może wykrywać mutację BRAF V600E przy poziomie mutacji  $\geq 5\%$  z zastosowaniem standardowego stężenia o wartości 125 ng/25 µl. Zdolność opisywanego testu do wykrywania mutacji przy niższych poziomach wejściowych DNA pokazuje, że mutacja może zostać wykryta nawet w próbkach zawierających DNA zdegradowany w procesie utrwalenia. Wszystkie testy uzyskane dla próbki naturalnie występującej sekwencji BRAF dały wynik „Mutation Not Detected”.

### Czułość analityczna, badana z użyciem próbek FFPET

W celu potwierdzenia deklaracji wykrywania mutacji 5% w próbkach pacjenta czterdzieści osiem oddzielnych skrawków o grubości 5 µm z każdej z 3 próbek FFPET zawierających mutację BRAF V600E na poziomie mutacji 6%, 12%, i 4% zostało przetworzonych oddzielnie z zastosowaniem 3 serii zestawu do przygotowania próbek **cobas**® DNA Sample Preparation Kit w celu wyizolowania DNA. W celu oceny wpływu melaniny na test, jedna próbka (mutacja 6%) miała wysokie stężenie melaniny. Przygotowano seryjne rozcieńczenia DNA pochodzące z każdego skrawka w celu uzyskania zestawu 6 elementów panelu, które wyszczególniono w Tabela 5.

**Tabela 5**  
**Przygotowanie elementów panelu rozcieńczeń otrzymanych z próbek FFPET**

Próbka FFPET	Informacje o próbce		Ilość DNA w elementach panelu rozcieńczeń (ng/25 µl)
	Średni udział % mutacji V600E*	Pigmentacja	
Próbka 1	6%	Wysoko pigmentowane**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Próbka 2	12%	NHP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Próbka 3	4%	NHP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

\* Średni udział procentowy mutacji w próbce, określony przez sekwencjonowanie metodą 454.

\*\* Wysoko pigmentowane na podstawie oceny wizualnej, stężenie melaniny = 0,17 µg/25 µl.

\*\*\* NHP = Niepigmentowane wysoko (ang. Not Highly Pigmented) na podstawie oceny wizualnej.

Wykonano 16 powtórzeń każdego elementu panelu z użyciem każdej z 3 serii zestawu **cobas** BRAF (n = 48/elementu panelu). Czułość dla każdej z próbek FFPET określono na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dotyczących mutacji BRAF V600E, wynoszący co najmniej 95% (szare wiersze). Wyniki omawianego badania przedstawiono w Tabela 6.

**Tabela 6**  
**Czułość testu cobas BRAF z zastosowaniem próbek FFPET**

Próbka FFPET	Udział procentowy mutacji na podstawie sekwencjonowania metodą 454	Ilość DNA w elemencie panelu	Odsetek wyników „Mutation Detected” (n = 48)
Próbka 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%
Próbka 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%
Próbka 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%

Wyniki tego badania wykazały, że test **cobas** BRAF może wykrywać mutację BRAF V600E w przetwarzanych próbkach klinicznych FFPET przy poziomie mutacji ≥ 5% z zastosowaniem standardowego stężenia o wartości 125 ng/25 µl. Zdolność opisywanego testu do wykrywania mutacji przy niższych poziomach wejściowych DNA pokazuje, że mutacja może zostać wykryta nawet w próbkach zawierających DNA zdegradowany w procesie utrwalenia. Jedna wysoko pigmentowana próbka objęta badaniem prawdopodobnie nie wpłynęła na czułość testu.

### Czułość analityczna z zastosowaniem mieszaniny linii komórkowych

Roztwory podstawowe DNA pochodzące z dwóch linii komórkowych czerniaka [SK-MEL 28 (mutacja BRAF V600E) i SK-MEL 2 (naturalnie występująca sekwencja BRAF)] zostały zmieszane w celu uzyskania próbki o poziomie mutacji 5%, która została zweryfikowana przez sekwencjonowanie metodą 454. Przygotowano trzy oddzielne panele rozcieńczeń, zawierające od 125 ng/25 µl do 0 ng/25 µl DNA. Z zastosowaniem każdej z 3 serii zestawu **cobas** BRAF zbadano 20 powtórzeń każdego elementu panelu (w sumie 60 powtórzeń). Czułość określono na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dotyczących mutacji BRAF V600E, wynoszący co najmniej 95% (szary wiersz). Wyniki omawianego badania przedstawiono w Tabeli 7.

**Tabela 7**  
**Czułość testu cobas BRAF z zastosowaniem mieszanin linii komórkowych**

Mieszanina linii komórkowych	Średni udział procentowy mutacji na podstawie sekwencjonowania metodą 454	Ilość DNA w elemencie panelu	Odsetek wyników „Mutation Detected” (n = 60)
Mieszanina linii komórkowych	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%

Test **cobas** BRAF dał 95% wyników „Mutation Detected” przy stężeniu o wartości 3,9 ng/25 µl, co odzwierciedla rozcieńczenie w stosunku 1:32 zalecanego stężenia wejściowego DNA o wartości 125 ng/25 µl. Może to wskazywać, że test wykryje mutację BRAF V600E w przypadku degradacji ~97% DNA z powodu procesu utrwalenia, zakładając, że DNA linii komórkowej zawierał w 100% nienaruszony i nadający się do amplifikacji DNA.

### Wejściowy zakres genomowy

Zalecana ilość wejściowego DNA dla testu **cobas** BRAF wynosi 125 ng. Różne ilości wejściowego DNA genomowego mogą wynikać z błędów oceny ilościowej DNA i/lub zmiennej ilości zdegradowanego DNA. W celu oceny wpływu różnych ilości wejściowego DNA genomowego, DNA genomowe wyodrębniano z 11 próbek FFPE czerniaka wybranych pod względem statusu mutacji i poziomu pigmentacji, a następnie dokonano rozcieńczeń seryjnych z próbkami wejściowymi odzwierciedlającymi 250 ng, 125 ng, 62,5 ng i 31,3 ng/25 µl. Wszystkie 4 poziomy DNA oceniano za pomocą 2 serii. Wyniki oczekiwane uzyskano dla wszystkich poziomów wejściowych DNA genomowego.

### Minimalna zawartość tkanki guza

Trzydzieści trzy (33) próbki zawierające mutację BRAF V600E poddano testowi w celu określenia minimalnej proporcji guza wymaganej do wykrywania mutacji BRAF V600E w próbkach zawierających od 5% do 50% tkanki guza, bez przecinania makroskopowego. Jeden (1) skrawek pochodzący z każdej z próbek poddano testowi **cobas** BRAF.

Test **cobas** BRAF prawidłowo wykrywał wszystkie próbki mutantów BRAF V600E, które zawierały co najmniej 5% DNA mutantu i gdy minimalna zawartość tkanki guza wynosiła co najmniej 15%, jak przedstawia to Tabela 8. próbki zawierające poniżej 15% tkanki guza i z poziomem mutacji poniżej 5% były zgłaszane jako brak wykrycia mutacji. Ponadto przy zalecanym stężeniu DNA wejściowego 125 ng/25 µl oceniono 24 próbki naturalnie występujące o zawartości guza od 5% do 45%. Wszystkie próbki naturalnie występujące zostały prawidłowo określone. W przypadku próbek zawierających < 50% tkanki guza wg powierzchni wymagane jest ich przecięcie makroskopowe.

**Tabela 8**  
**Wyniki przebadania 33 próbek zawierających mutację BRAF V600E o różnym odsetku procentowym tkanki guza i odsetku procentowym mutacji**

Numer próbki	Zawartość tkanki guza*	% mutacji	Wynik testu
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

Numer próbki	Zawartość tkanki guza*	% mutacji	Wynik testu
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

*\* Zawartość tkanki guza w próbce została oceniona przez anatomopatologa na podstawie badania pierwszego i ostatniego z dwunastu sąsiadujących skrawków o grubości 5 µm każdej z próbek. Przedstawiono zawartość tkanki guza w pierwszym i ostatnim skrawku (na przykład 95%/95%).*

### Reaktywność krzyżowa

Reaktywność krzyżową testu **cobas** BRAF oceniono badając następujące rodzaje próbek:

- próbki FFPET czerniaka zawierające mutanty BRAF inne niż V600E o różnych poziomach mutacji,
- plazmidy mutacji BRAF innych niż V600E,
- plazmidy homologów BRAF,
- drobnoustroje występujące w skórze.

Reaktywność krzyżową poddano także ocenie, określając, czy obecność plazmidów homologu BRAF lub mikroorganizmów występujących w skórze zakłóciła detekcję mutacji BRAF V600E.

**Próbki FFPET czerniaka zawierające mutacje BRAF inne niż V600E**

Czternaście (14) próbek FFPET czerniaka zawierających mutacje BRAF inne niż V600E (V600D, V600E2, V600R lub V600K) zbadano w trzech powtórzeniach za pomocą testu **cobas** BRAF. Spośród ośmiu próbek BRAF innych niż V600E, wszystkie trzy powtórzenia wykazywały reaktywność krzyżową z testem **cobas** BRAF. Te osiem próbek to: mutant BRAF V600D (18% mutacji), mutant BRAF V600E2 (68% mutacji) lub mutant BRAF V600K (ponad 30% mutacji). Nie odnotowano reaktywności krzyżowej w przypadku próbek zawierających mutację BRAF V600R (23% mutacji) (Tabela 9).

**Tabela 9**  
**Częstości wykrywania mutacji testu cobas BRAF obserwowane w próbkach FFPET zawierających mutacje inne niż BRAF V600E**

Numer próbki	Status mutacji BRAF	Odsetek procentowy mutacji	Zawartość tkanki guza*	Stadium guza	Odsetek wyników „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%	

\* Zawartość tkanki guza w próbce została oceniona przez anatomopatologa na podstawie badania pierwszego i ostatniego z dwunastu sąsiadujących skrawków o grubości 5 µm każdej z próbek. Przedstawiono zawartość tkanki guza w pierwszym i ostatnim skrawku (na przykład 95%/95%).

Przygotowano jedenastoelementowy panel rozcieńczeń o stężeniach DNA wahających się od 5,0 ng/µl aż do 0,0049 ng/µl (co odpowiada od 125 do 0,1 ng zawartości DNA w 25 µl objętości wejściowej dla testu), a każdy z elementów panelu przebadano trzykrotnie w celu określenia najmniejszej ilości DNA, która dała 100-procentowy odsetek wyników „Mutation Detected” dla ośmiu próbek wykazujących reaktywność krzyżową w teście **cobas** BRAF. Najniższe odnotowane wejściowe ilości DNA przed utratą reaktywności krzyżowej próbki wynosiło od 0,5 ng/25 µl dla próbki zawierającej mutację BRAF V600K o 69% mutacji do 15,6 ng/25 µl dla próbki zawierającej mutację BRAF V600D o 18% mutacji (Tabela 10).

**Tabela 10**  
**Najniższe ilości wejściowe DNA do wykrycia reaktywności krzyżowej testu cobas BRAF**

Numer próbki	Status mutacji BRAF	Odsetek procentowy mutacji	Najniższe stężenie wejściowe DNA przed utratą w reaktywności krzyżowej (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

### Plazmidy inne niż BRAF V600E

Przygotowano panele rozcieńczeń plazmidów o poziomach mutacji wynoszących od 5% do 75% w tle naturalnie występujących plazmidów dla następujących dziewięciu mutacji innych niż BRAF V600E: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K i V600R. Za pomocą testu **cobas** BRAF zbadano trzy powtórzenia każdego członka paneli rozcieńczeń przygotowanych z każdego plazmidu. Reaktywność krzyżową zaobserwowano w przypadku 3 powtórzeń plazmidu BRAF V600D o  $\geq 10\%$  mutacji, plazmidu BRAF V600K o  $\geq 35\%$  mutacji i plazmidu BRAF V600E2 o  $\geq 65\%$  mutacji. W przypadku plazmidów pochodzących z sześciu innych przebadanych mutacji BRAF nie odnotowano reaktywności krzyżowej.

### Plazmidy homologów BRAF

Przygotowano próbki dla trzech plazmidów homologów BRAF (pseudogen BRAF, ARAF oraz RAF1), plazmidu mutacji BRAF V600E oraz naturalnie występującego plazmidu BRAF, tak jak przedstawiono w Tabeli 11. Od trzech do sześciu powtórzeń każdego z elementów panelu przebadano za pomocą testu **cobas** BRAF.

**Tabela 11**  
**Próbki plazmidów homologów BRAF**

Panel		Struktura z uwzględnieniem objętości	
Nazwa	Element	Składnik 1	Składnik 2
Pseudogen BRAF	1	95% pseudogen BRAF	5% mutacja BRAF V600E
	2	100% pseudogen BRAF	- - -
ARAF	1	95% ARAF	5% mutacja BRAF V600E
	2	100% ARAF	- - -
RAF1	1	95% RAF1	5% mutacja BRAF V600E
	2	100% RAF1	- - -
Próba kontrolna	1	95% naturalnie występujący gen BRAF	5% mutacja BRAF V600E
	2	100% naturalnie występujący gen BRAF	- - -
	3	95% DNA bufor do elucji	5% mutacja BRAF V600E

Żaden z trzech przebadanych oddzielnie plazmidów homologów BRAF nie został wykryty przez test **cobas** BRAF, co wskazuje, że plazmidy homologów BRAF nie dają reakcji krzyżowej w teście.

5% plazmidu zawierającego mutację BRAF V600E w obecności plazmidów homologów BRAF w ilości 95% we wszystkich przypadkach dał oczekiwany wynik „Mutation Detected”, co wskazuje, że plazmidy homologów nie zakłóciły procesu detekcji mutacji BRAF V600E.

### Drobnoustroje występujące w skórze

Stwierdzono, że wymienione niżej drobnoustroje występujące w skórze nie wykazują reaktywności krzyżowej w teście **cobas** BRAF po dodaniu podczas etapu lizy tkanki do próbki FFPET czerniaka zawierającej naturalnie występujące sekwencje w ilości  $1 \times 10^6$  jednostek tworzących kolonie (CFU):

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

Badane drobnoustroje nie zakłócały także detekcji próbki FFPET z 8% mutacją BRAF V600E po dodaniu podczas etapu lizy tkanki w ilości  $1 \times 10^6$  jednostek tworzących kolonie (CFU).

### Substancje wpływające na wynik testu

Wykazano, że triglicerydy ( $\leq 74$  mM,  $2\times$  granica podwyższonego stężenia, zalecana przez Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]<sup>17</sup>), hemoglobina ( $\leq 2$  mg/ml,  $1\times$  granica podwyższonego stężenia, zalecana przez CLSI<sup>17</sup>) oraz obecność  $\leq 95\%$  tkanki martwiczej nie zakłócają działania testu **cobas** BRAF w przypadku dodania potencjalnej substancji zakłócającej podczas procedury przygotowania próbki na etapie lizy.

## Melanina

Wpływ wysokich stężeń endogennej melaniny oceniano używając próbek FFPET o wysokiej pigmentacji melaniną. Łącznie na podstawie poziomu ich pigmentacji wybrano 41 unikalnych próbek FFPET tkanki guza czerniaka: 33 wykazywały wysoką pigmentację, 3 pochodziły od Afroamerykanów i 5 dla porównania było słabo pigmentowanych. Dla każdej próbki oznaczano uzyskane z tych próbek DNA oraz stężenie melaniny. Zbadano jedno powtórzenie roztworu podstawowego DNA z każdego z dwóch skrawków pochodzących z każdej z 41 próbek. Trzy próbki dały wyniki nieważne. Jedna próbka dała wyniki „Mutation Not Detected”, ale była ona oznaczana poniżej granicy wykrywalności. 3 próbki z wynikami „Invalid” zostały użyte do przygotowania zalecanego stężenia DNA do testu oraz dwukrotnego, czterokrotnego i ośmiokrotnego rozcieńczenia zalecanego DNA wejściowego stężenia DNA 125 ng/PCR. Uzyskane rozcieńczone próbki DNA (zawierające łącznie 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng lub 15,6 ng DNA w 25 µl) badano ponownie w celu określenia, czy odpowiednio zmniejszenie zawartości melaniny przez rozcieńczenie pozwoliło uzyskać ważne wyniki. Wszystkie trzy próbki po rozcieńczeniu dwukrotnym dały wyniki prawidłowe.

**Tabela 12**  
**Podsumowanie działania testu cobas BRAF z pigmentowanymi próbkami FFPET czerniaka**

Numer identyfikacyjny (ID) próbki	Rozcieńczanie	Ilość melaniny w próbce/PCR	Wynik
1	Brak (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Dwukrotne (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Czterokrotne (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Ośmiokrotne (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Brak (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Dwukrotne (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Czterokrotne (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Ośmiokrotne (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Brak (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Dwukrotne (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Czterokrotne (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Ośmiokrotne (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Wyniki badania 17 próbek naturalnie występującej sekwencji wykazują, że wszystkie próbki zostały prawidłowo oznaczone jako „Mutation Not Detected” z wyjątkiem 2 próbek o wysokiej pigmentacji, które dawały wyniki fałszywie dodatnie.

## SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA

### Odtwarzalność

Przeprowadzono badanie w celu oceny odtwarzalności testu **cobas** BRAF z 3 zewnętrznymi ośrodkami badawczymi (2 operatorów na ośrodek), 3 seriami odczytników przez 5 niekolejnych dni badania z 8-elementowym panelem próbek DNA uzyskanych ze skrawków FFPET czerniaka złośliwego. Ten panel zawierał zarówno próbki pigmentowane, jak i niepigmentowane oraz szereg różnych zawartości procentowych guza i odsetka alleli mutantów, w tym jedną próbka z 5% granicą wykrywalności. Na 94 przebiegi 92 (97,9%) było ważnych. Na 1442 próbki badane, 2 próbki (0,14%) dały wyniki nieważne. Dla wszystkich elementów panelu z wyjątkiem próbek granicy wykrywalności, ważne było 100% testów, w tym elementy panelu o 20% mutacji i dwa elementy panelu określone jako o wysokiej pigmentacji. W przypadku elementów panelu granicy wykrywalności mutację V600E wykrywano w 90% (162/180) próbek. W przypadku próbek WT nie było wyników fałszywie dodatnich. Podsumowując, test **cobas** BRAF Test był wysoce odtwarzalny zarówno dla próbek pigmentowanych oraz niepigmentowanych, próbek o niskiej zawartości guza oraz niskim odsetku procentowym alleli mutacji i dla różnych ośrodków badawczych, operatorów, serii odczytników i dni badania. Swoistość analityczna wynosiła 100%.

### Korelacja z metodą referencyjną dla próbek badań klinicznych fazy III

Częstość występowania mutacji V600E w badaniu klinicznym fazy III na podstawie wyników testu **cobas** BRAF wyniosła 46,5%. Jest to zgodne z opisywaną w piśmiennictwie częstością występowania mutacji V600E u pacjentów z czerniakiem.

W celu oceny skuteczności testu **cobas** BRAF po porównaniu z metodą dwukierunkowego sekwencjonowania 2× metodą Sangera, zidentyfikowano 596 kolejnych pacjentów poddanych badaniu przesiewowemu do badania klinicznego fazy III preparatu wemurafenib, dla których zbierano dane kliniczne, demograficzne i sekwencjonowania metodą Sangera. Spośród nich 94 było nie do przyjęcia ze względu na brak kryteriów włączenia, 4 przypadki nie miały badania patologicznego, a 2 miały nieważne wyniki testu **cobas** BRAF. Spośród pozostałych 496 przypadków, 47 próbek miało nieważne wyniki sekwencjonowania metodą Sangera pozostawiając 449 przypadki nadające się do oceny. Analizę zgodności między wynikami testów **cobas** BRAF i sekwencjonowania metodą Sangera dla wykrywania mutacji V600E przedstawiono poniżej w Tabeli 13.

**Tabela 13**  
**Podsumowanie wyników testu cobas BRAF z sekwencjonowaniem metodą Sangera**

Test cobas BRAF (metoda badania)	Sekwencjonowanie metodą Sangera (metoda referencyjna)		
	Wykryta mutacja BRAF V600E <sup>a</sup>	Nie wykryto mutacji BRAF V600E <sup>b</sup>	Ogółem
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Ogółem	222	227	449
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% CI)	100% × 216/222 = 97,3% (94,2%, 98,8%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% CI)	100% × 192/227 = 84,6% (79,3%, 88,7%)		
Procentowa zgodność ogółem (95% CI)	100% × 408/449 = 90,9% (87,8%, 93,2%)		

<sup>a</sup> Wynik „Mutation Detected” wskazuje na obecność dominującego typu mutacji BRAF, V600E (1799 T>A), zidentyfikowanego metodą Sangera.

<sup>b</sup> Wynik „Mutation Not Detected” wskazuje na brak dominującego typu mutacji BRAF, V600E, zidentyfikowanego metodą Sangera (tj. naturalnie występująca sekwencja lub brak mutacji, V600D, V600E2, V600K, V600R i inne mutacje).

Uwaga: próbki czerniaka z ważnymi wynikami sparowanymi z testu **cobas** BRAF oraz sekwencjonowania metodą Sangera.

Uwaga: CI = (punktacja) przedział ufności.

Wszystkie 41 próbek dających niezgodne wyniki testów **cobas** BRAF i sekwencjonowania metodą Sangera poddano sekwencjonowaniu metodą 454 (metoda ilościowego pirosekwencjonowania równoległego) jako drugiej metody referencyjnej. Ponadto 33 próbki zgodne w testach **cobas** BRAF i sekwencjonowania metodą Sangera zbadano za pomocą sekwencjonowania metodą 454. Analizę zgodności drugorzędowej po rozwiązaniu niezgodności przedstawiono w Tabeli 14.

Spośród 6 próbek niezgodnych dających w teście **cobas** BRAF wynik „Mutation Not Detected” i wynik V600E w sekwencjonowania metodą Sangera, sekwencjonowanie metodą 454 dało wynik naturalnie występujący dla 5/6 próbek (jedna próbka miała nieważny wynik metody 454).

Spośród 8/35 próbek niezgodnych dających wynik „Mutation Detected” w teście **cobas** BRAF i wynik WT sekwencjonowania metodą Sangera, sekwencjonowanie metodą 454 wykryło mutację V600E dla 7/8 próbek (jedna próbka miała nieważny wynik metody 454).

Spośród 27/35 próbek niezgodnych dających wynik „Mutation Detected” w teście **cobas** BRAF i wynik inny niż V600E sekwencjonowania metodą Sangera Sanger, sekwencjonowanie metodą 454 wykryło mutację V600K w 24 próbkach, V600E2 w jednej próbce i V600E w jednej próbce. W 1 próbce test Sanger wykrył mutację V600D, a sekwencjonowanie metodą 454 dało wynik naturalnie występujący.

Reaktywność krzyżowa testu **cobas** BRAF dla V600K wyniosła 66% (25/38).

Zgodność z sekwencjonowaniem metodą 454 wyniosła 100% dla 33 próbek V600E i WT zgodnych w teście **cobas** BRAF/ sekwencjonowaniu metodą Sangera.

**Tabela 14**  
**Wyniki testu cobas BRAF wobec wyników sekwencjonowania metodą Sangera po rozwiązaniu niezgodności przez sekwencjonowanie metodą 454**

Test cobas BRAF (metoda badania)	Po rozwiązaniu niezgodności przez sekwencjonowanie metodą 454		
	Wykryta mutacja BRAF V600E	Nie wykryto mutacji BRAF V600E	Ogółem
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Ogółem	225	224	449
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% CI)	100% × 224/225 = 99,6% (97,5%, 99,9%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% CI)	100% × 197/224 = 87,9% (83,0%, 91,6%)		
Procentowa zgodność ogółem (95% CI)	100% × 421/449 = 93,8% (91,1%, 95,7%)		

### Rozkład mutacji kodonu 600 genu BRAF

Rozkład mutacji kodonu 600 określono dla 496 kwalifikujących się przypadków na podstawie złożenia wyników testów Sanger'a i sekwencjonowania metodą 454. Spośród tych 496 przypadków, 182 przypadków było występującymi naturalnie, a 314 przypadków mutantami. Rozkład mutacji kodonu 600 wśród 314 przypadków dodatnich mutacji przedstawiono w Tabeli 15. Mutacje V600K zidentyfikowano w 13,4% przypadków z mutacją kodonu 600.

**Tabela 15**  
**Rozkład mutacji kodonu 600 genu BRAF populacji z mutacjami określonymi za pomocą testu Sanger i/lub sekwencjonowania metodą 454**

Sekwencja aminokwasowa (kodon 600)	Sekwencja nukleotydomowa (1798–1800)	N	% rozkładu
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
Łącznie mutacje kodonu 600		314	100
Łącznie naturalnie występujący kodon 600		182	---

### Skuteczność kliniczna leku ZELBORAF® (wemurafenib)<sup>9</sup>

Test **cobas** BRAF był stosowany jako dodatkowy test do selekcji pacjentów do leczenia lekiem ZELBORAF®. Bezpieczeństwo i skuteczność kliniczna leku ZELBORAF® została wykazana w badaniu NO25026 (BRIM3), międzynarodowym, randomizowanym, otwartym, kontrolowanym, wieloośrodkowym badaniu fazy III u nieleczonych wcześniej pacjentów z nieresekcyjnym czerniakiem w stadium IIIC lub IV z mutacją V600E BRAF w celu oceny skuteczności klinicznej leku ZELBORAF® w porównaniu z dakarbazyną (terapia standardowa). Próbkę FFPET od wszystkich pacjentów z czerniakiem rozważanych jako kandydaci do leczenia były badane przy użyciu testu **cobas** BRAF. Pacjenci z wynikiem testu „Mutation Detected” kwalifikowali się do włączenia do badania leku, jeżeli spełniali inne kryteria. Pacjenci z wynikiem testu „Mutation Not Detected” nie kwalifikowali się do włączenia do badania leku. Badanie przeprowadzono w około 104 ośrodkach na całym świecie (22 ośrodki w Stanach Zjednoczonych).

Do badania włączono 675 pacjentów; 337 zrandomizowano do otrzymywania wemurafenibu, a 338 do otrzymywania dakarbazyny. Główną miarą skuteczności było całkowite przeżycie (ang. *Overall Survival*, OS) i oceniane przez badacza przeżycie bez progresji (ang. *Progression-Free Survival*, PFS). Inne miary efektu obejmowały potwierdzony, oceniony przez badacza współczynnik odpowiedzi całkowitej.

Charakterystyka wyjściowa była zrównoważona między grupami leczenia. Większość pacjentów była mężczyznami (56%) i należała do rasy białej (99%), mediana wieku wynosiła 54 lata (24% było w wieku  $\geq 65$  lat), wszyscy pacjenci mieli status wydajności ECOG równy 0 lub 1, a większość pacjentów miała chorobę przerzutową (95%).

Wyniki skuteczności badania przedstawiono poniżej w Tabeli 16 i na Rysunek 2:

**Tabela 16**  
**Skuteczność wemurafenibu u pacjentów wcześniej nieleczonych z czerniakiem z dodatnim wynikiem mutacji BRAFV600E<sup>a</sup>**

	Wemurafenib (N = 337)	Dakarbazyna (N = 338)	Wartość p <sup>d</sup>
<b>Przeżycie całkowite</b>			
Liczba zgonów	78 (23%)	121 (36%)	-
Współczynnik ryzyka (95% przedział ufności) <sup>b</sup>	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Mediana przeżycia (miesiące) (95% CI) <sup>c</sup>	NR <sup>e</sup> (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Mediana kontroli (miesiące) (zakres)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Stosunek ryzyka dla przeżycia bez progresji (95% CI) <sup>b</sup>	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Mediana PFS (miesiące) <sup>c</sup>	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

<sup>a</sup> Jak wskazano w teście **cobas** BRAF

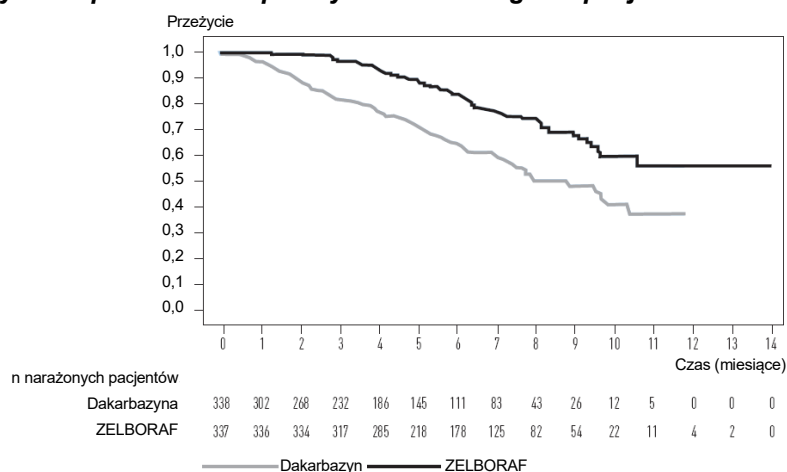
<sup>b</sup> Współczynnik ryzyka szacowany przy użyciu modelu Coxa, współczynnik ryzyka < 1 faworyzuje wemurafenib

<sup>c</sup> Szacunkowe wartości Kaplana-Meiera

<sup>d</sup> Niestratyfikowany test logarytmiczny rang

<sup>e</sup> Nie osiągnięto

**Rysunek 2**  
**Krzywe Kaplana-Meiera przeżycia całkowitego — pacjenci wcześniej nieleczeni**



Potwierdzony, oceniony przez badacza najlepszy współczynnik odpowiedzi całkowitej wynosił 48,4% (95% CI: 41,6%, 55,2%) w grupie leku ZELBORAF® w porównaniu do 5,5% (95% CI: 2,8%, 9,3%) w grupie dakarbazyne.

#### **Skuteczność kliniczna leku COTELLIC® (kobimetynib)<sup>10, 11</sup>**

Lek COTELLIC®, inhibitor MEK, badano w badaniu klinicznym (coBRIM) w skojarzeniu z lekiem ZELBORAF® w porównaniu do leku ZELBORAF® plus placebo. Test **cobas** BRAF zastosowano do określenia kwalifikowalności do włączenia pacjentów do tego badania klinicznego. Bezpieczeństwo i skuteczność skojarzenia leków COTELLIC® i ZELBORAF® ustalono w wielośrodkowym, randomizowanym (1:1), prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowanym placebo badaniu prowadzonym z udziałem 495 pacjentów z wcześniej nieleczonym, nieresekcyjnym lub przerzutowym czerniakiem mającym dodatni wynik mutacji BRAF V600. Główną miarą skuteczności było oceniane przez badacza przeżycie bez progresji (PFS) zgodnie z RECIST v1.1. Dodatkowymi miarami skuteczności były ocenione przez badacza, potwierdzony współczynnik odpowiedzi obiektywnej (ang. *Objective Response Rate*, ORR), przeżycie całkowite (OS), PFS oceniane za pomocą zaślepionej niezależnej oceny centralnej i czas trwania odpowiedzi (DOR).

Charakterystyka wyjściowa była zrównoważona między grupami leczenia. Większość pacjentów była mężczyznami (58%) i należała do rasy białej (93%), mediana wieku wynosiła 55 lat, 72% pacjentów miało status wydajności ECOG równy 0 i 60% pacjentów miało chorobę w stadium M1c.

Próbki FFPET od wszystkich pacjentów rozważanych jako kandydaci do leczenia były badane przy użyciu testu **cobas** BRAF. Pacjenci z wynikiem „Mutation Detected” kwalifikowali się do włączenia do badania, jeżeli spełniali inne kryteria. Pacjenci z wynikiem „No Mutation Detected” nie kwalifikowali się do włączenia do badania. Badanie obejmowało pacjentów z mutacjami BRAF V600K wykrytymi przez test **cobas** BRAF, wykazując bezpieczeństwo i skuteczność produktu terapeutycznego w części populacji pacjentów z wykrywanymi guzami zawierającymi mutację V600K.

Wyniki skuteczności badania przedstawiono poniżej w Tabeli 17 i na Rysunek 3:

**Tabela 17**  
**Skuteczność kobimetynibu w skojarzeniu z wemurafenibem u pacjentów z czerniakiem z dodatnim wynikiem mutacji BRAF<sup>a</sup>**

	Kobimetynib + wemurafenib (N = 247)	Placebo + wemurafenib (N = 248)	Wartość p
<b>Przeżycie bez progresji (oceniane przez badacza)</b>			
Liczba zdarzeń (%)	143 (58%)	180 (73%)	
Progresja	131	169	
Zgon	12	11	
Mediana PFS (miesiące) (95% CI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Współczynnik ryzyka (95% przedział ufności) <sup>b</sup>	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 <sup>d</sup>
<b>Przeżycie całkowite</b>			
Liczba zgonów (%)	79 (32%)	109 (44%)	
Mediana przeżycia (miesiące) (95% CI) <sup>c</sup>	Nieszacowalne (20,7, nieszacowalne)	17,0 (15,0, nieszacowalne)	-
Współczynnik ryzyka (95% przedział ufności) <sup>b</sup>	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 <sup>d, e</sup>
<b>Współczynnik odpowiedzi obiektywnej</b>			
Współczynnik odpowiedzi obiektywnej (95% CI) <sup>c</sup>	70% (64%, 75%)	50% (44%, 56%)	< 0,001
Odpowiedź pełna	16%	10%	
Odpowiedź częściowa	54%	40%	
Mediana czasu trwania odpowiedzi, miesiące (95% CI) <sup>c</sup>	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

<sup>a</sup> Jak wskazano w teście **cobas** BRAF

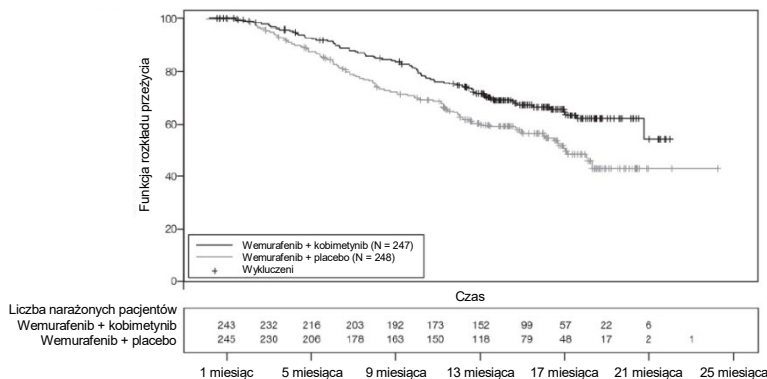
<sup>b</sup> Współczynnik ryzyka szacowany przy użyciu modelu Coxa, współczynnik ryzyka < 1 faworyzuje kobimetynib + wemurafenib

<sup>c</sup> Szacunkowe wartości Kaplana-Meiera

<sup>d</sup> Stratyfikowany test logarytmiczny rang

<sup>e</sup> Istotność statystyczna zależna od porównania alokowanego alfa 0,019 do tej analizy tymczasowej

**Rysunek 3**  
**Krzywe Kaplana-Meiera przeżycia całkowitego**



Dostępne próbki guza od randomizowanych pacjentów były analizowane retrospektywnie przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) w celu dalszej klasyfikacji mutacji BRAF jako V600E lub V600K; wyniki testu uzyskano u 81% randomizowanych pacjentów (400/495). Wśród tych pacjentów, u których z powodzeniem przeprowadzono NGS, 56 spośród 400 (14%) pacjentów miało guzy z mutacjami BRAF V600K, a pozostali pacjenci mieli guzy z mutacjami BRAF V600E. 56 guzów retrospektywnie ocenionych jako mających mutację BRAF V600K miało w tej analizie częstości od 5,1 do 36,6%. Trend faworyzujący kobimetynib z wemurafenibem zaobserwowano w analizach badawczych PFS, OS i ORR podgrup dla podtypów mutacji BRAF V600 u 81% pacjentów w tym badaniu, u których oznaczono typ mutacji BRAF V600.

## II. RAK BRODAWCZAKOWATY TARCZYCY (PTC)

### OCENA SKUTECZNOŚCI W BADANIACH NIEKLINICZNYCH

W przypadku opisanych niżej badań nieklinicznych za pomocą badania anatomopatologicznego oceniano charakterystykę guza, taką jak procentowa zawartość tkanki guza. Do selekcji próbek przeznaczonych do badania użyto dwukierunkowego sekwencjonowania metodą Sangera. Poziom % mutacji oznaczono za pomocą sekwencjonowania metodą 454 (metoda ilościowego pyrosekwencjonowania równoległego).

#### Czułość analityczna

##### **Czułość analityczna — granica wykrywalności (ang. *Limit of Detection*, LoD)**

Za pomocą paneli rozcieńczeń przygotowanych z dwóch rodzajów próbek oceniono minimalną ilość wejściowego DNA, która daje prawidłowe wyniki w 95% przypadków:

- Mieszanki próbek przygotowane przez zmieszanie roztworów podstawowych DNA otrzymanych z próbek FFPET mutacji BRAF V600E oraz próbek FFPET naturalnie występującego genu BRAF w celu uzyskania określonych poziomów mutacji.
- Pojedyncze roztwory podstawowe DNA FFPET przygotowane z dwóch próbek FFPET mutantu BRAF V600E.

Wszystkie próbki wykorzystane w tym badaniu zostały poddane procesowi oznaczenia sekwencji przez sekwencjonowanie metodą 454 w celu określenia udziału procentowego mutacji każdej z próbek.

##### **Czułość analityczna, badana z użyciem mieszanin próbek**

Roztwór podstawowy DNA z próbek FFPET zawierających mutację BRAF V600E został zmieszany z roztworami podstawowymi DNA próbek FFPET zawierającymi naturalnie występujący gen BRAF w celu uzyskania jednej próbki o poziomie mutacji ~10%, jednej próbki o poziomie mutacji ~5% i jednej próbki o poziomie mutacji ~2%. Po zmieszaniu poziomy mutacji zostały poddane weryfikacji przez sekwencjonowanie metodą 454. Każda z trzech mieszanin próbek zawierających mutację V600E została następnie rozcieńczona, dając elementy paneli, które wyszczególniono w Tabeli 18.

**Tabela 18**  
**Przygotowanie elementów panelu rozcieńczeń otrzymanych z mieszanin próbek**

Mieszanina	Średni udział % mutacji*	Ilość DNA w elementach panelu rozcieńczeń (ng/25 µl)**
10-procentowa mieszanina	10%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5-procentowa mieszanina	5%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5-procentowa mieszanina	2%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0% (tylko naturalnie występujące sekwencje)	---	125

\* Średni udział procentowy mutacji w mieszaninie, zbadany przez sekwencjonowanie metodą 454.

\*\* Ilość genomowego DNA zawartego w każdym elemencie panelu. 25 µl to wejściowa dla testu objętość próbki.

Wykonano 8 powtórzeń każdego elementu panelu z użyciem każdej z 3 serii zestawu **cobas** BRAF (n = 24/elementu panelu). Tabela 19 przedstawia czułość dla każdej z mieszanin FFPET, określoną na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dotyczących mutacji BRAF V600E, wynoszący co najmniej 95% (szare wiersze).

**Tabela 19**  
**Czułość analityczna testu cobas BRAF badana z użyciem mieszanin próbek FFPET**

Mieszanina próbek FFPET	Udział procentowy mutacji na podstawie sekwencjonowania metodą 454	Ilość DNA w elemencie panelu	Odsetek wyników „Mutation Detected” (n = 24)
10-procentowa mieszanina próbek FFPET	10%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	100%
		0,5 ng/25 µl	92%
		0,2 ng/25 µl	83%
		0,1 ng/25 µl	29%
5-procentowa mieszanina próbek FFPET	5%	125 ng/25 µl	96%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	83%
		0,5 ng/25 µl	54%
		0,2 ng/25 µl	67%
		0,1 ng/25 µl	25%
2,5-procentowa mieszanina próbek FFPET	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% (naturalnie występujące sekwencje)	---	125 ng/25 µl	0%

Wyniki tego badania wykazują, że test **cobas** BRAF może wykrywać mutację BRAF V600E przy poziomie mutacji  $\geq 5\%$  z zastosowaniem standardowego stężenia o wartości 125 ng/25 µl. Zdolność opisywanego testu do wykrywania mutacji przy niższych poziomach wejściowych DNA pokazuje, że mutacja może zostać wykryta nawet w próbkach zawierających DNA zdegradowany w procesie utrwalenia. Wszystkie testy uzyskane dla próbki naturalnie występującej sekwencji BRAF dały wynik „Mutation Not Detected”.

### **Czułość analityczna, badana z użyciem próbek FFPET**

W celu potwierdzenia deklaracji wykrywania mutacji 5% w próbkach pacjenta dwadzieścia cztery oddzielne skrawki o grubości 5 µm z dwóch próbek FFPET zawierających mutację BRAF V600E na poziomie mutacji 6% i 11% przetworzono oddzielnie z zastosowaniem 3 serii zestawu do przygotowania próbek **cobas**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit w celu wyizolowania DNA. Przygotowano seryjne rozcieńczenia DNA pochodzące z każdego skrawka w celu uzyskania zestawu 8 elementów panelu, które wyszczególniono w Tabeli 20.

**Tabela 20**  
**Przygotowanie elementów panelu rozcieńczeń otrzymanych z próbek FFPET**

	Średni udział % mutacji V600E*	Ilość DNA w elementach panelu rozcieńczeń (ng/25 µl)
Próbka 1	6%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Próbka 2	11%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

\* Średni udział procentowy mutacji w próbce, określony przez sekwencjonowanie metodą 454.

Wykonano 8 powtórzeń każdego elementu panelu z użyciem każdej z 3 serii zestawu **cobas** BRAF (n = 24/elementu panelu). Czułość dla każdej z próbek FFPET określono na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dotyczących mutacji BRAF V600E, wynoszący co najmniej 95% (szare wiersze). Wyniki omawianego badania przedstawiono w Tabeli 21.

**Tabela 21**  
**Czułość testu cobas BRAF z zastosowaniem próbek FFPET**

Próbka FFPET	Udział procentowy mutacji na podstawie sekwencjonowania metodą 454	Ilość DNA w elemencie panelu	Odsetek wyników „Mutation Detected” (n = 48)
Próbka 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%
Próbka 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%

Wyniki tego badania wykazały, że test **cobas** BRAF może wykrywać mutację BRAF V600E w przetwarzanych próbkach klinicznych FFPET przy poziomie mutacji  $\geq 5\%$  z zastosowaniem standardowego stężenia o wartości 125 ng/25 µl. Zdolność opisywanego testu do wykrywania mutacji przy niższych poziomach wejściowych DNA pokazuje, że mutacja może zostać wykryta nawet w próbkach zawierających DNA zdegradowany w procesie utrwalenia.

### **Powtarzalność**

Przeprowadzono badanie w celu oceny powtarzalności testu **cobas** BRAF z dwoma seriami odczynników, dwoma operatorami przez cztery dni badania z pięcioma próbkami FFPET raka brodawczakowatego tarczycy. Te próbki FFPET obejmowały zakres odsetka zawartości guza (50–70%) i odsetka alleli mutantów (16–22%), w tym dwie próbki mutantu V600E przy ~16–18% mutacji (~3 × LoD). Prawidłowo określono 100% zbadanych próbek (80/80). W przypadku próbek WT nie było wyników fałszywie dodatnich. Podsumowując, test **cobas** BRAF był wysoce powtarzalny dla próbek o niskiej zawartości guza oraz niskim odsetku procentowym alleli mutacji w przypadku różnych operatorów, serii odczynników i dni badania.

### Korelacja z metodą referencyjną

W celu oceny skuteczności testu **cobas** BRAF po porównaniu z metodą dwukierunkowego sekwencjonowania bezpośredniego 2× (Sanger) zebrano dane Sangera dla 159 próbek FFPET PTC. Analizę pierwszorzędowej zgodności między wynikami testu **cobas** BRAF i sekwencjonowania Sangera dla wykrywania mutacji V600E przedstawiono poniżej, w Tabeli 22, dla jednej z dwóch badanych serii odczynników. Druga seria dała podobne wyniki z wyjątkiem tego, że dla jednej próbki uzyskano wynik „Mutation Not Detected”. Dzięki analizie za pomocą sekwencjonowania metodą 454 ustalono, że próbka zawierała 1,4% mutacji i była poniżej 5% prognozy czułości deklarowanego dla testu **cobas** BRAF.

**Tabela 22**  
**Podsumowanie wyników testu cobas BRAF z sekwencjonowaniem metodą Sangera**

<b>Test cobas BRAF (metoda badania)</b>	<b>Seqwencjonowanie metodą Sangera (metoda referencyjna)</b>		
	<b>Wykryta mutacja BRAF V600E<sup>a</sup></b>	<b>Nie wykryto mutacji BRAF V600E<sup>b</sup></b>	<b>Ogółem</b>
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Ogółem	89	70	159
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% CI)	100% × 88/89 = 98,9% (93,9%, 99,8%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% CI)	100% × 57/70 = 81,4% (70,8%, 88,8%)		
Procentowa zgodność ogółem (95% CI)	100% × 145/159 = 91,2% (85,8%, 94,7%)		

<sup>a</sup> Wynik „Mutation Detected” wskazuje na obecność dominującego typu mutacji BRAF, V600E (1799 T>A), zidentyfikowanego metodą Sanger.

<sup>b</sup> Wynik „Mutation Not Detected” wskazuje na brak dominującego typu mutacji BRAF, V600E, zidentyfikowanego metodą Sanger (tj. naturalnie występująca sekwencja lub brak mutacji i inne mutacje).

Uwaga: CI = (punktacja) przedział ufności.

Wszystkie próbki dające niezgodne wyniki testów **cobas** BRAF i sekwencjonowania metodą Sangera poddano sekwencjonowaniu metodą 454 (metoda ilościowego pirosekwencjonowania równoległego) jako drugiej metody referencyjnej. Analizę zgodności drugorzędowej po rozwiązaniu niezgodności przedstawiono w Tabeli 23.

Jedna próbka niezgodna miała wynik „Mutation Not Detected” w teście **cobas** BRAF i wynik V600E w sekwencjonowaniu metodą Sangera, sekwencjonowanie 454 dało wynik naturalnie występujący zgodny z testem **cobas** BRAF.

W dwunastu spośród trzynastu próbek niezgodnych, w których mutację wykryto testem **cobas** BRAF i naturalnie występującą sekwencją metodą Sanger, po sekwencjonowaniu metodą 454 uzyskano mutację V600E (częstość allelu 1,2–19%), zgodnie z testem **cobas** BRAF.

Jedna pozostała próbka niezgodna, która miała wynik V600E „Mutation Detected” w teście **cobas** BRAF była naturalnie występująca w sekwencjonowaniu metodą Sangera i była również naturalnie występująca w sekwencjonowaniu 454. Późniejsza dodatkowa analiza sekwencjonowania metodą 454 potwierdziła, że próbka była mutantem V600E o niskim odsetku.

**Tabela 23**  
**Wyniki testu cobas BRAF wobec wyników sekwencjonowania metodą Sangera po rozwiązaniu niezgodności przez sekwencjonowanie metodą 454**

<b>Test cobas BRAF (metoda badania)</b>	<b>Seqwencjonowanie metodą Sangera po rozwiązaniu niezgodności przez sekwencjonowanie metodą 454</b>		
	<b>Wykryta mutacja BRAF V600E</b>	<b>Nie wykryto mutacji BRAF V600E</b>	<b>Ogółem</b>
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Ogółem	101	58	159
Zgodność procentowa wyników dodatnich (95% CI)	100% × 101/101 = 100,0% (96,3%, 100,0%)		
Zgodność procentowa wyników ujemnych (95% CI)	100% × 57/58 = 98,3% (90,9%, 99,7%)		
Procentowa zgodność ogółem (95% CI)	100% × 158/159 = 99,4% (96,5%, 99,9%)		

## LISTA FLAG WYNIKÓW

Flagi wyników są dostępne na karcie Results (Wyniki). Źródło flagi jest podane w kodzie flagi, patrz poniższa Tabela 24. Tabela 25 wymienia wszystkie flagi interpretacji wyników, które są istotne dla użytkownika.

**Tabela 24**  
**Źródło flagi**

Kod flagi zaczyna się od	Źródło flagi	Przykład
M*	Wiele lub inne powody	M6
R	Interpretacja wyników	R200
Z*	Analizator	Z1

\* Patrz podręcznik operatora systemu **cobas**® 4800 System lub podręcznik użytkownika **cobas**® 4800 System.

**Tabela 25**  
**Lista flag interpretacji wyników**

Kod flagi	Natężenie	Opis	Zalecane działanie
R200	Błąd	Kontrola mutacji nieważna	<p>Powtórz przebieg testowy. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla kontroli mutacji była mniejsza od ustalonej wartości granicznej (tj. za niski pik). Taki błąd może występować w razie zanieczyszczenia DNA lub w wyniku błędu algorytmu z powodu nietypowego wzoru fluorescencji.</li><li>2. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla kontroli mutacji była większa od ustalonej wartości granicznej (tj. za wysoki pik). Może to nastąpić w przypadku 1) niewłaściwego przygotowania roboczego odczynnika Master Mix, 2) błędu pipetowania przy dodawaniu odczynnika Master Mix do dołka reakcyjnego płytki mikrodołkowej lub 3) błędu pipetowania przy dodawaniu kontroli mutacji do dołka reakcyjnego płytki mikrodołkowej.</li></ol>
R201	Błąd	Kontrola naturalnie występującej mutacji nieważna.	<p>Powtórz przebieg testowy. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla kontroli naturalnie występującej mutacji była mniejsza od ustalonej wartości granicznej (tj. za niski pik). Taki błąd może występować w razie zanieczyszczenia DNA lub w wyniku błędu algorytmu z powodu nietypowego wzoru fluorescencji.</li><li>2. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla kontroli naturalnie występującej mutacji była większa od ustalonej wartości granicznej (tj. za wysoki pik). Może to nastąpić w przypadku 1) niewłaściwego przygotowania roboczego odczynnika Master Mix, 2) błędu pipetowania przy dodawaniu odczynnika Master Mix do dołka reakcyjnego płytki mikrodołkowej lub 3) błędu pipetowania przy dodawaniu kontroli naturalnie występującej mutacji do dołka reakcyjnego płytki mikrodołkowej.</li></ol>
R202	Błąd	Nie wykryto Ct mutacji.	<p>Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza, że dla próbki nie zaobserwowano wartości punktu przejścia dla mutacji. Może to wskazywać brak mutacji w próbce lub jeden z następujących powodów:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Niski odsetek sekwencji mutacji, poniżej granicy wykrywalności testu.</li><li>2. Niską jakość genomowego DNA w próbce.</li><li>3. Nieodpowiednie przetworzenie próbki.</li><li>4. Obecność inhibitorów PCR w próbce.</li><li>5. Występowanie rzadkich mutacji w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się startery i/lub sonda mutacji.</li><li>6. Błąd pipetowania lub mogło nie dojść do dodania DNA próbki do dołka reakcyjnego.</li></ol>

Kod flagi	Natężenie	Opis	Zalecane działanie
R203	Błąd	Nie wykryto Ct naturalnie występującej sekwencji.	<p>Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza, że dla próbki nie zaobserwowano wartości punktu przejścia dla naturalnie występującej sekwencji. Brak wartości punktu przejścia sugeruje jeden z następujących problemów:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Niską jakość genomowego DNA w próbce.</li> <li>2. Nieodpowiednie przetworzenie próbki.</li> <li>3. Obecność inhibitorów PCR w próbce.</li> <li>4. Występowanie rzadkich mutacji w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się startery i/lub sonda typu występującego naturalnie.</li> <li>5. Mogło nie dojść do dodania DNA próbki do co najmniej jednej studzienki.</li> </ol>
R204	Błąd	Ct mutacji poza zakresem.	<p>Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla mutacji w próbce była mniejsza od ustalonej wartości granicznej (tj. za niski pik). Może to występować w razie znacznego przeładowania mieszaniny PCR stężonym genomowym DNA lub w wyniku błędu algorytmu na skutek nietypowego wzoru fluorescencji.</li> <li>2. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla mutacji w próbce była większa od ustalonej wartości granicznej (tj. za wysoki pik). Może to wskazywać na przynajmniej jedno z poniższych: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Niski odsetek sekwencji mutacji, poniżej granicy wykrywalności testu.</li> <li>• Błąd pipetowania przy dodawaniu DNA próbki do dołka reakcyjnego.</li> <li>• Niską jakość genomowego DNA w próbce.</li> <li>• Nieodpowiednie przetworzenie próbki.</li> <li>• Obecność inhibitorów PCR w próbce.</li> <li>• Występowanie rzadkich mutacji w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się startery i/lub sonda mutacji.</li> </ul> </li> </ol>
R205	Błąd	Ct naturalnie występującej sekwencji poza zakresem.	<p>Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz ulotka dołączona do opakowania testu</p> <p>Ten kod flagi oznacza:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla naturalnie występującej sekwencji w próbce była mniejsza od ustalonej wartości granicznej (tj. za niski pik). Może to występować w razie znacznego przeładowania mieszaniny PCR stężonym genomowym DNA lub w wyniku błędu algorytmu na skutek nietypowego wzoru fluorescencji.</li> <li>2. Zaobserwowana wartość punktu przejścia dla naturalnie występującej sekwencji w próbce była większa od ustalonej wartości granicznej (tj. za wysoki pik). Może to wskazywać na przynajmniej jedno z poniższych: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Błąd pipetowania przy dodawaniu DNA próbki do dołka reakcyjnego.</li> <li>• Niską jakość genomowego DNA w próbce.</li> <li>• Nieodpowiednie przetworzenie próbki.</li> <li>• Obecność inhibitorów PCR w próbce.</li> <li>• Występowanie rzadkich mutacji w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się startery i/lub sonda typu występującego naturalnie.</li> </ul> </li> </ol>

## PIŚMIENICTWO

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

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 10.0 08/2019	<p>Zaktualizowano części <b>ZASTOSOWANIE</b> i <b>PODSUMOWANIE ORAZ OPIS TESTU</b>.</p> <p>Dodano części <b>Skuteczność kliniczna leku ZELBORAF® (wemurafenib)</b> oraz <b>Skuteczność kliniczna leku ZOTELLIC® (kobimetynib)</b>.</p> <p>Dodano informacje o stabilności preparatu w części <b>POBIERANIE, TRANSPORT I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK</b>.</p> <p>Dodano deklarację dotyczącą melaniny do części <b>OGRANICZENIA METODY</b>.</p> <p>Dodano ogólne aktualizacje językowe w celu zamieszczenia objaśnień i uspoźnienia z Instrukcją użytkownika testu <b>cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test</b> posiadającego oznaczenie US-IVD.</p> <p>W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielstwem firmy Roche.</p>
11/2019	<p>Skorygowano „FFFPET” na „FFPET” oraz symbol „większe lub równe” na stronie 24 do właściwej prezentacji w pliku PDF.</p> <p>Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami.</p> <p>W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielstwem firmy Roche.</p>
Doc Rev. 11.0 06/2020	<p>Usunięto poniższe informacje o zestawie DNA Sample Preparation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• listy odczynników i informacja o składzie</li> <li>• powiązane etapy i uwagi proceduralne</li> </ul> <p>Na początku i w części Ograniczenia metody dodano odwołanie do instrukcji użytkownika zestawu <b>cobas® DNA Sample Preparation Kit</b>.</p> <p>Zaktualizowano odniesienia do systemu i podręcznika operatora na odniesienia do „podręcznika użytkownika systemu <b>cobas® 4800</b> lub podręcznika użytkownika systemu <b>cobas® 4800</b>”.</p> <p>Wprowadzono poprawki literówek i zaktualizowano w celu uspoźnienia i standaryzacji języka oraz uspoźnienia z instrukcją obsługi dla USA.</p> <p>Dodano flagi wyników.</p> <p>Zaktualizowano odwołanie do Międzynarodowego Zrzeszenia Przewoźników Powietrznych (IATA, International Air Transport Association).</p> <p>Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami, część ze znakami towarowymi i patentami oraz adresy dystrybutorów.</p> <p>Dodano oświadczenie wyjaśniające, że oznakowanie bezpieczeństwa produktu zasadniczo spełnia wytyczne GHS UE.</p> <p>W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielstwem firmy Roche.</p>

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



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

### Znaki towarowe i patenty

COBAS, COBAS Z i AMPERASE są znakami towarowymi firmy Roche.

Inne nazwy produktów i znaki towarowe są własnością odpowiednich podmiotów.

Technologia zapobiegania zanieczyszczeniu preparatu enzymu AmpErase resztkami jest chroniona patentem USA nr 7,687,247 stanowiącym własność firmy Life Technologies; udostępniono ją na zasadzie licencji firmie Roche Molecular Systems, Inc.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.
























06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-11



Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

	Oprogramowanie pomocnicze		Kod partii
	Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej		Zagrożenie biologiczne
	Arkusze kodów kreskowych		Numer katalogowy
	Sprawdź w instrukcji obsługi		Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD
	Zawartość wystarczająca na <n> testów		Dolna granica przypisanego zakresu
	Zawartość zestawu		Wytwórca
	Dystrybucja		Przechowywać z dala od światła
	Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>		Przestrzegać zakresu temperatury
	Plik definicji testów		Termin przydatności
	Górna granica przypisanego zakresu		Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
	Numer globalny jednostki handlowej		Data produkcji
	Oznaczenie zgodności CE — wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>		

Pomoc techniczna dla klientów w Stanach Zjednoczonych 1-800-526-1247