

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

cobas®

IN VITRO DIAGNOSTİK KULLANIM İÇİNDİR.

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Örnek hazırlama bilgileri için bkz. **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

KULLANIM AMACI

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test'in temel kullanım amacı, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü insan melanom ve papiller tiroid karsinomu (PTC) dokusundan ekstrakte edilen DNA'da BRAF V600 mutasyonlarının saptanmasıdır. Melanomda test, tek başına ZELBORAF® (vemurafenib) ya da ZELBORAF® (vemurafenib) ile kombinasyon halinde COTELLIC® (kobimetinib) ile tedavi için tümörleri BRAF V600 mutasyonları taşıyan hastaların seçilmesinde yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

TEST ÖZETİ VE AÇIKLAMASI

Proto-onkogen BRAF'de aktive edici mutasyonlar; malign melanom, kolorektal kanser, over kanseri ve tiroit kanseri dahil olmak üzere insanlarda görülen birçok kanser türünde meydana gelir.^{1,2} BRAF mutasyonları, malign melanom vakalarının %40–60'ında³ ve papiller tiroit karsinomu vakalarının %36–46'sında tanımlanmıştır.^{4,5} BRAF mutasyonları, ayrıca benign nevüslerde (benlerde) de yaygındır⁶ ve bu durum, bu mutasyonların çok erken meydana gelen olaylar olduğunu düşündürmektedir. Melanom, PTC ve diğer insan tümörlerinde BRAF genindeki bu somatik mutasyonların keşfi, BRAF kinazın hücreyel proliferasyonu, ayrıştırmayı ve hücre ölümünü kontrol eden sinyal yollarındaki önemli rolünü aydınlatmaya yardımcı olmuştur. Normal hücrelerde BRAF; RAS, RAF, MEK ve ERK yoluyla büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR gibi) etkilerine aracılık eden, oldukça regüle bir sinyal yolağının parçasıdır. BRAF'deki onkogenik mutasyonlar, kinaz fonksiyonu kazanımına yol açar ve tipik büyüme faktörlerinin yokluğunda sürekli aktif olan RAF-MEK-ERK yolağını verir.

Melanom, PTC ve diğer insan tümörlerinde BRAF mutasyonlarının çoğu, 600. kodonda meydana gelir.⁷ 600. kodonda ağırlıklı olarak görülen mutasyon, V600E mutasyonudur (GTG > GAG). Temel olarak melanomda ve nadiren kolorektal kanseri gibi diğer tümörlerde olmak üzere, 600. kodonu etkileyen çok sayıda dinükleotit mutasyonu da [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) ve V600D (GTG > GAT)] daha az yaygın şekilde gözlenmiştir.

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test, V600E (T1799A) mutasyonunun varlığını saptamak üzere tasarlanmış gerçek zamanlı bir PCR testidir. **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test, BRAF'nin mutant V600E versiyonunu inhibe eden bir bileşik olan vemurafenib için birlikte uygulanan bir tanı testi olarak kullanılmaktadır. İleri evre melanomlu hastalarda vemurafenib klinik araştırmaları, V600E mutant tümör bulunan hastaların bileşikten klinik yarar sağlamalarının muhtemel olduğunu göstermiştir.^{8,9} Sonrasında, ileri evre melanomlu hastalarda vemurafenib ile kombinasyon halinde kobimetinib'in incelendiği bir klinik araştırma, **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test ile saptanan V600E ya da V600K mutant tümörü bulunan hastaların bu tedaviden yarar sağlamalarının muhtemel olduğunu göstermiştir.^{10,11} V600K, BRAF V600 mutasyonları bulunan melanom örneklerinin yaklaşık %10–15'inde mevcuttur.¹²

PROSEDÜR PRENSİPLERİ

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (**cobas** BRAF Test) iki işleme dayanır: (1) formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü dokudan (FFPET) genomik DNA elde etmek için manuel örnek hazırlanması; (2) farklı floresan boyalarla etiketli iki oligonükleotid probu ve kompleman primer çifti kullanılarak hedef DNA'nın saptanması ve PCR amplifikasyonu. Bir prob, yabancı tip BRAF V600 sekansını saptamak ve bir prob, V600E mutasyon sekansını saptamak üzere tasarlanmıştır. İki harici çalışma kontrolü sağlanır ve yabancı tip allel internal, tam işlem kontrolü görevi görür.

Örneğin Hazırlanması

Cam fiberlere bağlanan nükleik aside dayalı manuel örnek preparatı olan **cobas®** DNA Sample Preparation Kit kullanılarak FFPET örnekleri işlenir ve genomik DNA izole edilir. FFPET örneğinin parafinden ayrılmış 5 µm'lik kısmı, nükleik asit açığa çıkaran ve açığa çıkarılan genomik DNA'yı DNazlardan koruyan bir proteaz ve kaotropik lizis/bağlayıcı tampon ile yüksek bir sıcaklıkta inkübasyon ile lizlenir. Sonrasında, lizis karışımına izopropanol eklenir ve karışım, cam fiber filtre eki ile birlikte bir kolondan santrifüjlenir. Santrifüj işlemi sırasında, genomik DNA, cam fiber filtrenin yüzeyine bağlanır. Tuzlar, proteinler ve diğer hücreyel safsızlıklar gibi bağlanmayan maddeler, santrifüj işlemi ile giderilir. Adsorbe edilen nükleik asitler yıkanır ve sonrasında, sulu çözelti ile elüte edilir. Genomik DNA miktarı, spektrofotometrik olarak belirlenir ve amplifikasyon ve saptama karışımına eklenmek üzere sabit bir konsantrasyona ayarlanır. Ardından, hedef DNA, **cobas** BRAF Test kit içinde verilen amplifikasyon ve saptama reaktifleri kullanılarak **cobas z 480** analizörde amplifikasyona tabi tutularak saptanır.

PCR Amplifikasyonu ve Saptama

Hedefin Seçilmesi

cobas BRAF Test, ekzon 15'te BRAF 600. kodon bölgesini içeren insan genomik DNA'sının 116 bazlı çift sekansını tanımlayan primerler kullanır. Tüm BRAF geni amplifikasyona tabi tutulmaz. **cobas** BRAF Test, BRAF geninde 600. kodonda valin-glutamik asit substitüsyonu (V600E) ile sonuçlanan nükleotid 1799 T > A değişikliğini saptamak üzere tasarlanmıştır. BRAF yabancı tip ve mutant DNA hedefine özgü floresan boyası ile işaretlenmiş TaqMan problemleri, sırasıyla yabancı tip ve mutant sekanslara bağlanır. Yabancı tip ve mutant sekanslar, her bir sekans için özel bir optik kanal kullanılarak saptanır.

Hedef Amplifikasyonu

Thermus türü Z05 DNA polimeraz, hedef amplifikasyon için kullanılır. İlk olarak, PCR reaksiyon karışımı, genomik DNA'yı denatüre etmek ve primer hedef sekanslarını açığa çıkarmak için ısıtılır. Karışım soğudukça, yukarı yönlü ve aşağı yönlü primerler hedef DNA sekanslarında yeniden birleşir. Z05 DNA Polimeraz, divalent metal iyon ve fazlalık dNTP'lerin varlığında, yeniden birleşen her bir primeri uzatarak ikinci bir DNA zincirini sentezler. Bu durum PCR'nin birinci döngüsünü tamamlayarak BRAF geninin hedeflenen 116 bazlı çift bölgesinin çift zincirli DNA kopyasını üretir. Bu işlem, belli sayıda döngü için tekrarlanır, her döngüde ampikon DNA'nın miktarını etkili bir şekilde iki katına çıkarır. Amplifikasyon, yalnızca primerler arasında BRAF geni bölgesinde meydana gelir.

Otomatik Gerçek Zamanlı Saptama

cobas BRAF Test, gerçek zamanlı PCR teknolojisinden yararlanır. Reaksiyondaki her bir hedefe özgü oligonükleotid probu, haberci işlevi görev floresan bir boya ve intakt bir prob içerisindeki haberci boyadan gelen floresan emisyonları absorbe eden (söndüren) bir söndürücü molekül ile işaretlenir. Her bir amplifikasyon döngüsü esnasında, ampikondaki tek zincirli DNA sekansına kompleman niteliğinde olan prob bağlanır ve sonrasında, Z05 DNA Polimerazın 5' ile 3' nükleaz aktivitesiyle klevajlanır. Haberci boya bu nükleaz aktivitesi ile söndürücüden ayrıldıktan sonra, haberci boyanın uygun ışık spektrumu ile tetiklendiği durumlarda karakteristik bir dalga boyunun floresanı ölçülebilir. Hedefe özgü BRAF yabanıl tip (WT) probu ve BRAF V600E mutasyon probunu işaretlemek üzere iki farklı haberci boya kullanılır. İki BRAF sekansının amplifikasyonu, özel optik kanallarda iki karakteristik dalga boyunda floresanın ölçülmesi ile tek bir reaksiyon kuyucuğunda bağımsız şekilde saptanabilir.

Selektif Amplifikasyon

Örnekten gelen hedef nükleik asidin selektif amplifikasyonu, **cobas** BRAF Test ile AmpErase (urasil-N-glikozilaz) enzimi ve deoksiüridin trifosfat (dUTP) kullanılarak gerçekleştirilir.¹³ AmpErase enzimi, timidin içeren DNA zincirlerini değil deoksiüridin içeren DNA zincirlerini tanıır ve bunların yıkımını katalize eder. Deoksiüridin doğal oluşumlu DNA'da yoktur ancak Reaction Mix reaktifinde nükleotid trifosfatlardan birisi olarak dUTP kullanıldığı için ampikonda her zaman mevcuttur; bu nedenle sadece ampikon deoksiüridin içerir. Deoksiüridin, kontamine edici ampikonu, hedef DNA'nın amplifiye edilmesi öncesinde AmpErase enzimiyle yıkılmaya maruz bırakır. Reaction Mix reaktifinde yer alan AmpErase enzimi, C1-konumunda deoksiriboz zincirini açarak deoksiüridin kalıntılarındaki deoksiüridin içeren DNA'nın klevajını katalize eder. Alkalin pH'da birinci ısı çevrim aşamasında ısıtıldığında, ampikon DNA zinciri deoksiüridinin konumunda kırılır, böylece DNA'nın amplifiye edilemez olmasını sağlar. AmpErase enzimi, 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yani ısı çevrim aşamalarının tümünde inaktiftir ve böylece hedef ampikonu yıkmaz.

REAKTİFLER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 test (M/N: 05985595190)			
Kit bileşenleri	Reaktif içeriği	Kit başına miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı^a
RXNMIX (Reaction Mix)	Trisin tamponu Potasyum asetat Potasyum hidroksit Gliserol Tween 20 EDTA %5 dimetil sülfoksit < %0,09 dNTPs < %0,10 Z05 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,10 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,003 Oligonükleotid aptamer %0,08 sodyum azit	3 × 0,16 mL	Yok
MGAC (Magnezyum asetat)	Magnezyum asetat %0,09 sodyum azit	3 × 0,15 mL	Yok
BRAF OM (BRAF Oligo Mix)	Tris-HCl tamponu EDTA %0,09 sodyum azit Poly rA RNA (sentetik) < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı BRAF primerleri < %0,01 floresan etiketli BRAF problemleri	3 × 0,13 mL	Yok
BRAF MUT (BRAF Mutant Control)	Tris-HCl tamponu EDTA Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azit BRAF mutant sekans içeren < %0,001 plazmid DNA (mikrobik) BRAF yabanıl tip sekans içeren < %0,001 plazmid DNA (mikrobik)	2 × 0,13 mL	Yok
BRAF WT (BRAF Wild-Type Control)	Tris-HCl tamponu EDTA Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azit BRAF yabanıl tip sekans içeren < %0,001 plazmid DNA (mikrobik)	2 × 0,13 mL	Yok
DNA SD (DNA Specimen Diluent)	Tris-HCl tamponu %0,09 sodyum azit	2 × 1 mL	Yok

^a Ürün güvenlik etiketi öncelikli olarak AB GHS kılavuzlarına tabidir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

A. **IN VITRO** DİAGNOSTİK KULLANIM İÇİNDİR.

- B. Bu test, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü doku örnekleri ile kullanım içindir.
- C. Ağızınızla pipetleme yapmayın.
- D. Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- E. Reaktiflerin mikrobik ve DNA kontaminasyonundan kaçının.
- F. Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.
- G. Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- H. Farklı kitlerden veya lotlardan alınan reaktifleri birlikte kullanmayın.
- I. Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinden temin edilebilir.
- J. Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı örneklerle ve **cobas® 4800** reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir.
- K. Çalışma ana karışımının DNA örnekleriyle kontaminasyonunu önlemek için, Amplifikasyon ve Saptama işlemleri DNA İzolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı, çalışma ana karışımı hazırlanmadan önce iyice temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit* çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir.
*** NOT: Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.**
- L. Örnekler, Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyogüvenlik (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*)¹⁴ ve CLSI Belgesi M29-A4'te¹⁵ tanımlanan güvenli laboratuvar uygulamaları kullanılarak bulaşıcı madde gibi değerlendirilmelidir.
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT** ve **DNA SD** sodyum azit içerir. Sodyum azit, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azitler oluşturabilir. Laboratuvardaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azit atılırken, azit birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
- N. Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu malzemelerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçının. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- O. Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- P. Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Q. **cobas z 480** analizörü temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. **cobas z 480** analizörü, **cobas® 4800** Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu ya da **cobas® 4800** Sistemi – Kullanıcı Yardımı belgesinde tarif edilen prosedürlere göre temizleyin.
- R. **cobas z 480** analizörün kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için **cobas® 4800** Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu ya da **cobas® 4800** Sistemi – Kullanıcı Yardımı belgesine bakın.
- S. Steril tek kullanımlık pipetlerin ve DNase içermeyen pipet uçlarının kullanılması önerilir.

SAKLAMA VE KULLANMA KOŞULLARI

- A. Reaktifleri dondurmayın.
- B. **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT** ve **DNA SD**'yi 2–8°C'de saklayın. Açıldıktan sonra, bu reaktifler 60 günde 4 kullanıma kadar veya son kullanma tarihine kadar (hangisi daha önceyse) stabildir.
- C. **BRAF OM** ve Çalışma Ana Karışımı (**BRAF OM** ve **MGAC**'nin **RXNMIX**'e eklenmesiyle elde edilir), uzun süreli ışık maruziyetine karşı korunmalıdır.
- D. Çalışma Ana Karışımı (**BRAF OM** ve **MGAC**'nin **RXNMIX**'e eklenmesiyle elde edilir), karanlık bir ortamda 2–8°C'de saklanmalıdır. Hazırlanan örnekler ve kontroller, Çalışma Ana Karışımı hazırlandıktan sonra 1 saat içinde eklenmelidir.
- E. İşlenen örnekler (ekstrakte edilen DNA), 15°C ila 30°C'de 24 saate kadar, 2°C ila 8°C'de 14 güne kadar veya -15°C ila -25°C'de 60 güne ya da -15°C ila -25°C'de saklandığında 3 kez dondurma çözme döngüsüne kadar stabildir. Ekstrakte edilen DNA, önerilen saklama süreleri içinde veya DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan **cobas®** DNA Sample Preparation Kit'in son kullanma tarihinden önce (hangisi daha önceyse) amplifikasyona tabi tutulmalıdır.
- F. Amplifikasyon, işlenen örnekler ve kontrollerin Çalışma Ana Karışımına (**BRAF OM** ve **MGAC**'nin **RXNMIX**'e eklenmesi ile elde edilir) eklendiği andan itibaren 1 saat içinde başlatılmalıdır.

SAĞLANAN MALZEMELER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test24 test
(M/N: 05985595190)

BRAF

RXNMIX

(Reaction Mix) (Doğal Düğmeli Kapak)

MGAC

(Magnesium acetate) (Sarı Düğmeli Kapak)

BRAF OM

(BRAF Oligo Mix) (Beyaz Düğmeli Siyah Kapak)

BRAF MUT

(BRAF Mutant Control) (Kırmızı Düğmeli Kapak)

BRAF WT

(BRAF Wild-Type Control) (Mavi Düğmeli Kapak)

DNA SD

(DNA Specimen Diluent) (Mor Düğmeli Kapak)

GEREKLİ OLAN FAKAT SAĞLANMAYAN MATERYALLER

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190)
- **cobas®** 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plağı (AD plağı) ve kapatıcı film (Roche M/N 05232724001)
- Ayarlanabilen Pipetleyiciler*: (kapasite 10 µL, 20 µL, 200 µL ve 1000 µL), aerosol bariyer ya da pozitif yer değiştirmeli DNaz içermeyen uçlar ile
- Kilitleme kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL steril, RNaz/DNaz içermeyen, PCR sınıfı) (Herhangi bir tedarikçi)
- DNA konsantrasyonunun ölçümü için spektrofotometre**
- Vorteks karıştırıcı**
- Mikrosantrifüj tüp rakları
- Tek kullanımlık eldivenler, pudrasız
- -25°C ila -15°C'de saklama kapasitesine sahip dondurucu
- * *Pipetleyiciler, üreticinin talimatlarına uygun şekilde ve belirtilen hacmin %3'ü dahilinde korunmalıdır. Belirtilen yerlerde örnekte bozulmayı ya da çapraz kontaminasyonu önlemek için, aerosol bariyer ya da pozitif yer değiştirmeli DNaz içermeyen uçlar kullanılmalıdır.*
- ** *Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.*

Cihaz ve Yazılım

- **cobas z** 480 Analizör
- **cobas®** 4800 SR2 Sistem Kontrol Ünitesi ve OSXP görüntü
- **cobas®** 4800 SR2 Sistem Yazılımı sürümü 2.0 veya üstü
- BRAF Analiz Paketi Yazılım sürümü 1.0 veya üstü
- Barkod Okuyucu (Roche M/N 05339910001)
- Yazıcı HP P2055d (Roche M/N 05704375001)

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, TAŞINMASI VE SAKLANMASI

NOT: Tüm örnekleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

A. Örneklerin Toplanması

FFPET örnekleri, **cobas** BRAF Test ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır.

B. Örneklerin Taşınması

FFPET örnekleri, 15–30°C'de taşınabilir. FFPET örneklerinin taşınması, etiyolojik ajanların taşınmasıyla ilgili ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.¹⁶

C. Örneklerin Saklanması

Toplama tarihinden sonra 12 aya kadar 15–30°C'de saklanan FFPET örneklerinin stabilitesi doğrulanmıştır. Slaytlara yerleştirilen FFPET 5 µm'lik kesitler, 60 güne kadar 15–30°C'de saklanabilir.

KULLANIM TALİMATLARI

NOT: *RXNMIX, MGAC ve BRAF OM dışındaki tüm reaktifler, kullanılmadan önce oda sıcaklığında olmalıdır. RXN MIX, MGAC ve BRAF OM, Çalışma Ana Karışımının hazırlanması için doğrudan 2–8°C'de saklama koşulundan alınabilir.*

NOT: *cobas® BRAF Test ile yalnızca en az %50 tümör hücresi içeren, 5 µm kalınlığındaki melanom ve PTC FFPET kesitleri kullanılmalıdır. %50'den az tümör hücresi içeren tüm örnekler, parafinden ayrıldıktan sonra makrodisseksiyon kesitlere ayrılmalıdır.*

NOT: *cobas z 480 analizörün ayrıntılı çalıştırma yönergeleri için bkz. cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı.*

Çalışma hacmi

cobas BRAF Test kit, en fazla 24 örnek artı kontrole kadar olmak üzere en az 3 örnek artı kontrol ile çalışma gerçekleştirecek şekilde tasarlanmıştır. 3'ten az örnek artı kontrol aynı anda çalıştırılabilir; ancak bu durum, kit ile toplam 24 örnek artı kontrolü çalıştırmak için yetersiz reaktif hacmine neden olabilir. **cobas** BRAF Test, 3 örnek artı kontrol için 8 çalışmaya yetecek kadar reaktif içerir. Her bir çalışmanın gerçekleştirilmesi için bir **cobas** BRAF Test Mutant Control [**BRAF MUT**] tekrarı ve bir **cobas** BRAF Test Wild-Type Control [**BRAF WT**] tekrarı gereklidir (bkz. "Kalite Kontrol" bölümü).

İş Akışı

NOT: *cobas BRAF Test, bir çalışmada en fazla 24 örnek için kullanılabilir.*

NOT: *Reaktif kullanımını maksimuma çıkarmak için test çalışmasının en az üç (3) hasta örneği artı kontrol içermesi gerekir.*

DNA izolasyonu

DNA, FFPET örneklerinden **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) kullanılarak izole edilir.

Makrodisseksiyon

Örnek alana göre %50'den az tümör içeriğine sahipse, örneğin örnek hazırlama işlemi kapsamında makrodisseksiyona tabi tutulması gerekir.

DNA Kantitasyonu

NOT: *DNA konsantrasyonu ölçümü, DNA izolasyonu prosedüründen hemen sonra ve saklama sürecinden önce gerçekleştirilmelidir.*

- Her bir DNA stokunu, kantitasyondan önce 5 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Üretici protokolüne uygun şekilde spektrofotometre kullanarak DNA kantitasyonu gerçekleştirin. **cobas®** DNA Sample Preparation Kit içinde sağlanan **DNA EB**'yi cihaz için kör ölçüm olarak kullanın. Ortalama 2 tutarlı değerlendirme gereklidir. İki ölçüm, DNA konsantrasyon değerlendirmeleri $\geq 20,0$ ng/µL olduğunda birbirinin $\pm 10\%$ 'u içinde olmalıdır. $< 20,0$ ng/µL DNA konsantrasyon değerlendirmeleri için iki ölçüm, $\pm 2,0$ ng/µL dahilinde olmalıdır.
- cobas** BRAF Test'in gerçekleştirilmesi için DNA stok konsantrasyonu ≥ 5 ng/µL olmalıdır.

NOT: *cobas BRAF Test'in gerçekleştirilmesi için her bir DNA stok konsantrasyonu en az 5 ng/µL olmalıdır. DNA stok konsantrasyonu < 5 ng/µL ise, bu örnek için parafinden ayırma işlemini, DNA izolasyonunu ve DNA kantitasyon prosedürlerini iki adet 5 µm'lik FFPET kesiti kullanarak tekrarlayın. Yerleştirilen örnekler için, parafinden ayırma işleminin ardından, her iki kesitten alınan dokuyu bir tüpün içinde birleştirin, dokuyu cobas® DNA Sample Preparation Kit'teki TLB ve PK içine daldırın ve DNA izolasyonu ve kantitasyon işlemini gerçekleştirin. Yerleştirilmeyen örnekler için, her iki kesitten alınan dokuyu bir tüpün içinde birleştirin ve parafinden ayırma, DNA izolasyonu ve kantitasyon gerçekleştirin. DNA stoku hala < 5 ng/µL ise, ilgili klinik merkezden başka bir FFPET örnek kesiti isteyin.*

NOT: *İşlenen örnekler (ekstrakte edilen DNA), 15°C ila 30°C'de 24 saate kadar, 2°C ila 8°C'de 14 güne kadar veya -15°C ila -25°C'de 60 güne ya da -15°C ila -25°C'de saklandığında 3 kez dondurma çözme döngüsüne kadar stabildir. Ekstrakte edilen DNA, önerilen saklama süreleri içinde veya DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan cobas® DNA Sample Preparation Kit'in son kullanma tarihinden önce (hangisi daha önceyse) amplifikasyona tabi tutulmalıdır.*

AMPLİFİKASYON VE SAPTAMA

NOT: Çalışma ana karışımının DNA örnekleriyle kontaminasyonunu önlemek için, Amplifikasyon ve Saptama işlemleri DNA İzolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı, çalışma ana karışımı hazırlanmadan önce iyice temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir. Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.

Cihaz düzeneği

cobas z 480 analizör düzeneğine ilişkin ayrıntılı yönergeler için bkz. **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı**.

Test İsteği Düzeneği

cobas BRAF Test iş akışı adımları için bkz. **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı**.

Örnek DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması:

DNA stokunun 5 ng/μL dilüsyonunun 25 μL'si kullanılarak (toplamda 125 ng), örnek başına yalnızca bir amplifikasyon/saptama işlemi çalıştırılır. Aşağıdaki talimatlar, ilk DNA stok konsantrasyonuna bağlı olarak 5 ng/μL'de en az 35 μL seyreltilmiş DNA stoku hazırlamaya ilişkin yönergeler içermektedir. Bu, daha küçük örnek hacimleri pipetlenirken meydana gelebilen varyasyonu önlemek için her bir örneğin en az 5 μL DNA stoku kullanmasını sağlayacaktır.

5 ng/μL ila 35 ng/μL arası Konsantrasyonlarda Örnek DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması

NOT: Örneklerden elde edilen DNA stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

NOT: DNA stokunun 5 ng/μL dilüsyonunun 25 μL'si kullanılarak (toplamda 125 ng), örnek başına yalnızca bir amplifikasyon/saptama işlemi çalıştırılır.

- A. Her bir örnek için aşağıdaki formülü kullanarak gerekli DNA stok miktarını belirleyin:
Gerekli DNA stok hacmi = $(35 \mu\text{L} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{ng}/\mu\text{L}$ cinsinden DNA stok konsantrasyonu
- B. Her bir örnek için aşağıdaki formülü kullanarak gerekli DNA Specimen Diluent (**DNA SD**) miktarını belirleyin:
 μL cinsinden gerekli DNA SD hacmi = $(35 \mu\text{L} - \mu\text{L}$ cinsinden gerekli DNA stok hacmi).
- Örnek:
DNA stok konsantrasyonu = 21 ng/μL
A. Gerekli DNA stok hacmi = $(35 \mu\text{L} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 21 \text{ ng}/\mu\text{L} = 8,3 \mu\text{L}$
B. μL cinsinden gerekli DNA SD hacmi = $(35 \mu\text{L} - 8,3 \mu\text{L}) = 26,7 \mu\text{L}$

> 35 ng/μL Konsantrasyonlarda Örnek DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması

NOT: Örneklerden elde edilen DNA stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

NOT: DNA stokunun 5 ng/μL dilüsyonunun 25 μL'si kullanılarak (toplamda 125 ng), örnek başına yalnızca bir amplifikasyon/saptama işlemi çalıştırılır.

- A. > 35 ng/μL DNA stok konsantrasyonlarında, seyreltilmiş DNA stokundan en az 35 μL hazırlamak için gerekli DNA Specimen Diluent (**DNA SD**) miktarını hesaplamak üzere aşağıdaki formülü kullanın. Bunun amacı, her bir örneğin en az 5 μL DNA stoku kullanmasını sağlamaktır.
 μL cinsinden gerekli DNA SD hacmi = $((5 \mu\text{L DNA stoku} \times \text{ng}/\mu\text{L cinsinden DNA stok konsantrasyonu}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L}$
- B. 5 μL DNA stokunu seyreltmek için hesaplanan **DNA SD** hacmini kullanın.
- Örnek:
DNA stok konsantrasyonu = 42 ng/μL
A. μL cinsinden gerekli DNA SD hacmi = $((5 \mu\text{L} \times 42 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L} = 37 \mu\text{L}$
B. 5 μL DNA stokunu seyreltmek için hesaplanan **DNA SD** hacmini kullanın.

Örnek Dilüsyonu

- A. Örnek ekleme alanında uygun örnek tayini ile etiketleyerek, örnek DNA stoku dilüsyonları için uygun sayıda 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri hazırlayın.
- B. Aerosol dirençli pipet ucu bulunan bir pipetleyici kullanarak, hesaplanan DNA Specimen Diluent (**DNA SD**) hacmini her bir etiketli örnek tüpüne pipetleyin.
- C. Her bir örnek DNA stokunu 10 saniye vorteksleyin.
- D. Aerosol dirençli pipet ucu bulunan bir pipetleyici kullanarak, her bir örnek DNA stokundan hesaplanan hacmi, nazikçe **DNA SD** içeren uygun şekilde etiketlenmiş tüpe pipetleyin. Her bir örnek için yeni bir pipet ucu kullanın.
- E. 10 saniye vorteksleyerek her bir seyreltilmiş örnek DNA stokunun kapağını kapatıp karıştırın.
- F. Eldiven değiştirin.

Çalışma ana karışımının (MMX) hazırlanması

NOT: ***BRAF Oligo Mix ve çalışma MMX ışığa duyarlıdır. Tüm açık BRAF OM ve çalışma MMX karışımları, uzun süreli ışık maruziyetine karşı korunmalıdır.***

A. Aşağıdaki formülü kullanarak gerekli **RXNMIX** hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli RXNMIX hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 10 \mu\text{L}$$

B. Aşağıdaki formülü kullanarak gerekli **BRAF OM** hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli BRAF OM hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 8 \mu\text{L}$$

C. Aşağıdaki formülü kullanarak gerekli **MGAC** hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli MGAC hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 7 \mu\text{L}$$

Tablo 1, çalışmaya dahil edilen örnek sayısına göre Çalışma MMX'in hazırlanması için ihtiyaç duyulan her bir reaktif hacmini belirlemek için kullanılabilir.

Tablo 1

Çalışma MMX için gerekli Reaktif Hacimleri											
Örnek Sayısı*											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µL	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µL	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µL	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Toplam Hacim, µL		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Örnek Sayısı + 2 Kontrol + 1

D. Uygun sayıda **RXNMIX**, **BRAF OM** ve **MGAC** flakonunu, 2–8°C'de saklandıkları konumdan alın. Her reaktifi 5 saniye vorteksleyin ve kullanmadan önce tüpün altındaki sıvıyı toplayın. Çalışma ana karışımı (MMX) için steril bir mikrosantrifüj tüpünü etiketleyin.

E. Etiketli MMX tüpüne hesaplanan **RXNMIX** hacmini ekleyin.

F. Etiketli MMX tüpüne hesaplanan **BRAF OM** hacmini ekleyin.

G. Etiketli MMX tüpüne hesaplanan **MGAC** hacmini ekleyin.

H. Yeterli karıştırdıktan emin olmak için tüpü 5 saniye boyunca vorteksleyin.

NOT: ***Yalnızca cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plağı (AD plağı) ve Kapatıcı Film (Roche M/N 05232724001) kullanın.***

I. Çalışma için gerekli AD plağının her bir reaksiyon kuyucuğuna dikkatli bir biçimde 25 µL çalışma MMX ekleyin. Pipet ucunun bu kuyucuğun dışındaki plağa temas etmesine izin vermeyin.

Kontrollerin ve Örneklerin Eklenmesi:

A. AD plağının **A01** kuyucuğuna 25 µL **BRAF MUT** Control ekleyin ve en az iki kez kuyucuk içinde çekip bırakmak için pipetleyiciyi kullanarak iyice karıştırın.

B. Yeni bir pipet ucu kullanarak, AD plağının **B01** kuyucuğuna 25 µL **BRAF WT** Control ekleyin ve en az iki kez kuyucuk içinde çekip bırakmak için pipetleyiciyi kullanarak iyice karıştırın.

NOT: ***Her çalışma, hem A01 konumunda BRAF MUT Control hem de B01 konumunda BRAF WT Control içermelidir; aksi halde çalışma cobas z 480 analizör tarafından geçersiz kılınacaktır.***

NOT: ***Örnekten örneğe geçebilecek kontaminasyona veya PCR reaksiyon tüpü kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için gerektiği biçimde eldivenlerinizi değiştirin.***

C. Aerosol dirençli pipet ucu bulunan bir pipetleyici kullanarak, AD plağındaki **C01** konumundan başlayarak ve aşağıda Şekil 1 içinde verilen şablonu takip ederek çalışma MMX içeren uygun kuyucuğa 25 µL seyreltilmiş örnek DNA'sı ekleyin. En az iki kez kuyucuk içinde aspire edip bırakmak için pipetleyiciyi kullanarak reaksiyonu karıştırın. Tüm sıvının kuyucuğun tabanında toplandığından emin olun.

NOT: ***Örnek DNA ve Kontroller, çalışma Ana Karışımı (MMX) hazırlandıktan sonra 1 saat içinde AD plağına eklenmelidir.***

Şekil 1

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

D. Tüm test örnekleri AD plakına eklenene kadar devam edin.

E. AD plakını kapatıcı film (plaklarla birlikte verilen) ile örtün. Kapatıcı filmin AD plakına sıkıca yapıştığından emin olmak için kapatıcı film aplikatörünü kullanın.

F. Amplifikasyon ve Saptama işlemini başlatmadan önce tüm sıvının her kuyucuğun tabanında toplandığını onaylayın.

NOT: Örnek DNA ve Kontrollerin çalışma MMX'e eklenmesinden sonra 1 saat içinde amplifikasyon ve saptama işlemi başlatılmalıdır.

PCR'nin başlatılması

BRAF iş akışı adımlarına ilişkin ayrıntılı yönergeler için bkz. **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı**.

Sonuçların Yorumlanması

NOT: Tüm çalışma ve örnek doğrulama işlemleri cobas® 4800 BRAF AP yazılımıyla gerçekleştirilir.

NOT: Geçerli bir çalışması hem geçerli hem de geçersiz örnek sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, örnek sonuçları Tablo 2'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 2
Örnek Sonuçlarının Yorumlanması

cobas BRAF Test Sonucu	Yorum
Mutation Detected	Ekzon 15'te BRAF 600. kodon bölgesinde V600 Mutasyonu Saptandı
Mutation Not Detected veya No Mutation Detected*	Ekzon 15'te BRAF 600. kodon bölgesinde V600 Mutasyonu Saptanmadı
Invalid	Sonuç geçersizdir. Aşağıdaki " Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi " adlı bölümde yer alan yönergeleri izleyerek geçersiz sonuç içeren örnekleri yeniden test edin.
Failed	Donanım veya yazılım hatası nedeniyle çalışma başarısız oldu.

* Mutasyon Saptanmadı sonucu, BRAF 600. kodon bölgesinde mutasyon varlığı olasılığını dışlamaz; sonuçlar, örnekte var olan mutant sekans kopyalarının sayısına bağlıdır ve örnek bütünlüğünden, izole edilen DNA miktarından ve etkileşimde bulunan maddelerin varlığından etkilenebilir.

Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi

A. “**AMPLİFİKASYON ve SAPTAMA**” bölümündeki “**Örnek DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması**” ve “**Örnek Dilüsyonu**” prosedürlerinden başlayarak geçersiz örnek DNA stokunda dilüsyon işlemini tekrarlayın.

Not: *DNA stokunda yeni bir dilüsyon işlemi için yeterli örnek DNA stoku kalmamışsa, yeni bir 5 µm'lik doku kesiti elde edin ve cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) ile DNA'yı izole edin, ardından aşağıdaki Adım B ile devam edin.*

B. “**Örnek Dilüsyonu**” kısmında açıklanan şekilde 5 ng/µL'ye DNA stok dilüsyonu işlemini gerçekleştirdikten sonra, seyreltilmiş DNA stokundan 20 µL alarak ve 20 µL DNA Specimen Diluent (**DNA SD**) ekleyerek ek bir 1:2 dilüsyon işlemi gerçekleştirin.

C. “**Çalışma Ana Karışımının (MMX) Hazırlanması**” kısmı ve amplifikasyon ve saptama prosedürünün kalan kısmı ile devam edin.

Not: *1:2 dilüsyon oranında yeniden test işleminden sonra örnek geçersiz olursa, yeni bir 5 µm FFPE kesiti ile cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) kullanarak DNA izolasyonu işleminden başlayıp bu örnek için tüm test prosedürünü tekrarlayın. Amplifikasyon ve saptama için 5 ng/µL'de standart 25 µL DNA (daha fazla seyreltilmeden) kullanılmalıdır.*

KALİTE KONTROL

cobas BRAF Test Mutant (**BRAF MUT**) Control ve Wild-Type (**BRAF WT**) Control her çalışmaya dahil edilir. Bir çalışma, hem **BRAF MUT** Control kuyucuğu (**A01**) hem de **BRAF WT** Control kuyucuğu (**B01**) geçerli kontrol durumuna sahipse geçerlidir. **BRAF MUT** Control ya da **BRAF WT** Control geçersizse çalışma tekrarlanmalıdır. Amplifikasyon ve saptama için kontrollerle birlikte yeni bir AD plağı düzeneği kurmak için önceden izole edilmiş örnek DNA stokundan yeni bir dilüsyon hazırlayın.

BRAF Mutant Control

BRAF MUT Control sonucu “Geçerli” olmalıdır. **BRAF MUT** Control sonuçları tutarlı bir geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek için yerel Roche ofisinizle iletişime geçin.

BRAF Wild-Type Control

BRAF WT Control sonucu “Geçerli” olmalıdır. **BRAF WT** Control sonuçları tutarlı bir geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek için yerel Roche ofisinizle iletişime geçin.

PROSEDÜR ÖNLEMLERİ

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar tekniği esastır. PCR bazlı testlerin yüksek analitik hassasiyeti nedeniyle, reaktifleri ve amplifikasyon karışımlarını kontaminasyondan korumaya dikkat edilmelidir.

PROSEDÜR İLE İLGİLİ SINIRLAMALAR

1. Yalnızca belirtilen örnek tiplerini test edin. **cobas** BRAF Test, yalnızca melanom ve PTC FFPE örnekleri ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır.
2. **cobas** BRAF Test, genomik DNA ekstraksiyonu için yalnızca **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190) kullanılarak doğrulanmıştır.
3. Mutasyonun saptanması, örnekte var olan mutant sekans kopyalarının sayısına bağlıdır ve örnek bütünlüğünden, izole edilen DNA miktarından ve etkileşimde bulunan maddelerin varlığından etkilenebilir.
4. Güvenilir sonuçlar; örnek için yeterli fiksasyon, taşıma, saklama ve işlemeye bağlıdır. Bu Kullanma Talimatı ve **cobas®** 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu veya **cobas®** 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı belgesinde belirtilen prosedürleri takip edin.
5. AmpErase enziminin **cobas** BRAF Test Reaction Mix'e eklenmesi, hedef DNA'nın selektif amplifikasyonunu sağlar; ancak reaktiflerin kontaminasyonunu önlemek için iyi laboratuvar uygulamaları ve bu Kullanma Talimatı belgesinde belirtilen prosedürlere tam uyum gereklidir.
6. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas®** 4800 Sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanılmalıdır.
7. Sadece **cobas®** 4800 Sisteminin bu ürünle kullanılması onaylanmıştır. Bu ürünle kullanılması onaylanmış başka bir PCR Sistemi yoktur.
8. Teknolojiler arasındaki içsel farklılıklardan ötürü, bir teknolojiye başka birine geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını değerlendirmek için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları önerilir.
9. Örnek fiksasyonu değişkenleri gibi diğer potansiyel değişkenlerin etkileri değerlendirilmemiştir.
10. Nadir de olsa **cobas** BRAF Test ile kullanılan primerler veya probler tarafından kapsanan BRAF geni bölgeleri içindeki mutasyonlar ve varyantlar, BRAF V600 allellerinin amplifikasyonunda ya da 600. kodonda mutasyon varlığının saptanmasında başarısızlığa neden olabilir.
11. PCR inhibitörlerinin varlığı, yanlış negatif ya da geçersiz sonuçlara yol açabilir.
12. Melanin, PCR reaksiyonlarının bilinen bir inhibitörüdür. DNA örnek hazırlama kiti, ekstraksiyon sırasında örnekten melanini giderir, ancak bir örnekteki melanin yine de geçersiz sonuçlara neden olabilir. Melanin inhibisyonundan şüphelenilirse, “Sonuçları Geçersiz Örneklerin Yeniden Test Edilmesi” kısmında açıklanan şekilde 1:2 dilüsyon ile testin tekrarlanması önerilir.
13. **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test, V600E dışı mutant örneklerle sınırlı çapraz reaktivite göstermektedir (V600K, V600D ve V600E2). Daha fazla bilgi için Melanom Klinik Dışı Performans Değerlendirmesi bölümüne bakın.
14. Bozunmuş DNA içeren FFPE örnekleri, testin mutasyon saptama becerisini etkileyebilir.
15. **cobas** 4800 BRAF Mutation Test, kalitatif bir testtir. Test, mutasyonun kantitatif ölçümleri için değildir.

I. MELANOM

KLİNİK DIŞI PERFORMANS DEĞERLENDİRMESİ

Aşağıda açıklanan klinik dışı çalışmalarda % tümör içeriği, patolojik incelemeye ve melanin içeriği, patolojik inceleye ve dahili melanin tayin testine göre değerlendirilmiştir. Test edilecek örnekleri seçmek için iki yönlü Sanger sekanslama kullanılmıştır. % mutasyon düzeyi, 454 sekanslama (kantitatif masif paralel pirosekanslama yöntemi) kullanılarak tayin edilmiştir.

Analitik Hassasiyet

Analitik hassasiyet (Saptama Limiti – LoD)

Denemelerin %95'inde doğru sonuçlar veren minimum DNA girdisi miktarı, üç tür örnekten hazırlanan dilüsyon panelleri kullanılarak değerlendirilmiştir:

- Belirli mutasyon düzeylerine ulaşmak için BRAF V600E mutant FFPET örneklerinden ve BRAF yabanıl tip FFPET örneklerinden elde edilen DNA stoklarının karıştırılması ile hazırlanan örnek karışımları.
- Üç BRAF V600E mutant FFPET örneğinden hazırlanan ayrı FFPET DNA stokları.
- BRAF V600E mutant hücre soyu ve BRAF yabanıl tip hücre soyundan elde edilen DNA stoklarının karıştırılması ile hazırlanan hücre soyu karışımı.

Bu çalışmada kullanılan tüm örnekler, her bir örneğin mutasyon yüzdesinin tayin edilmesi için 454 sekanslama ile sekanslanmıştır.

Örnek Karışımları ile Analitik Hassasiyet

BRAF V600E mutant FFPET örnek DNA stokları, ~%10 mutasyon düzeyinde bir örnek, ~%5 mutasyon düzeyinde üç örnek ve ~%3 mutasyon düzeyinde bir örnek elde etmek üzere BRAF yabanıl tip FFPET örnek DNA stokları ile karıştırılmıştır. Ayrıca bir BRAF yabanıl tip örnek de test edilmiştir. Karıştırma işleminin ardından, mutasyon düzeyleri 454 sekanslama ile doğrulanmıştır. V600E mutasyonu bulunan beş örnek karışımının her biri (yabanıl tip örnek değil), daha sonra Tablo 3 içinde ayrıntılı şekilde belirtilen panel öğelerini elde etmek üzere seyretilmiştir.

Tablo 3
Örnek Karışımlarından Dilüsyon Panel Öğelerinin Hazırlanması

Karışım	Ortalama % Mutasyon*	Dilüsyon Panel Öğelerindeki DNA Miktarı (ng/25 µL)**
%10 Karışım	%9 (n = 6)	125, 62,5, 31,3
%5 Karışım 1	%5 (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
%5 Karışım 2	%5 (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
%5 Karışım 3	%6 (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
%2,5 Karışım	%3 (n = 5)	125, 62,5, 31,3
%0 (Yalnızca yabanıl tip)	- - -	125

* 454 sekanslama ile test edilen karışımın ortalama mutasyon yüzdesi

** Her bir panel öğesinde yer alan genomik DNA miktarı. 25 µL, testin örnek girdi hacmidir.

Her bir panel ögesinden sekiz (8) tekrar, 3 **cobas** BRAF Test kit lotunun her biri (n = 24/panel ögesi) kullanılarak çalıştırılmıştır. Tablo 4, en az %95 BRAF V600E “Mutasyon Saptandı” oranı veren (gölgeli alanlar) en düşük DNA miktarı ile tayin edilen her bir FFPET karışımının hassasiyetini gösterir.

Tablo 4
FFPET Karışımları ile cobas BRAF Test hassasiyeti

FFPET Karışımı	454 Sekanslama ile Mutasyon Yüzdesi	Panel Ögesindeki DNA Miktarı	“Mutasyon Saptandı” Oranı (n = 24)
%10 FFPET Karışımı	%9	125 ng/25 µL	%100
		62,5 ng/25 µL	%100
		31,3 ng/25 µL	%100
%5 FFPET Karışımı 1	%5	125 ng/25 µL	%96
		5,0 ng/25 µL	%100
		2,5 ng/25 µL	%100
		1,3 ng/25 µL	%75
		0,6 ng/25 µL	%88
		0,3 ng/25 µL	%71
%5 FFPET Karışımı 2	%5	125 ng/25 µL	%100
		5,0 ng/25 µL	%92
		2,5 ng/25 µL	%100
		1,3 ng/25 µL	%96
		0,6 ng/25 µL	%58
		0,3 ng/25 µL	%50
%5 FFPET Karışımı 3	%6	125 ng/25 µL	%100
		5,0 ng/25 µL	%100
		2,5 ng/25 µL	%100
		1,3 ng/25 µL	%100
		0,6 ng/25 µL	%96
		0,3 ng/25 µL	%71
%2,5 FFPET Karışımı	%3	125 ng/25 µL	%0
		62,5 ng/25 µL	%4
		31,3 ng/25 µL	%4
%0 (Yabanıl Tip)	- - -	125 ng/25 µL	%0

Bu çalışma, **cobas** BRAF Test ile 125 ng/25 µL standart girdi kullanılarak $\geq$ %5 mutasyon düzeyinde BRAF V600E mutasyonu saptanabildiğini göstermektedir. Testin daha düşük DNA girdisi düzeylerinde mutasyonu saptayabilme kapasitesi, örneklerin fiksasyon işleminden bozunmuş DNA içerebileceğini ve yine de saptanabileceğini göstermektedir. BRAF yabanıl tip örnekler için elde edilen tüm test sonuçları, “Mutasyon Saptanmadı” olmuştur.

FFPET Örnekleri ile Analitik Hassasiyet

Hasta örneklerinde %5 mutasyon saptama iddiasını doğrulamak amacıyla, %6, %12 ve %4 mutasyon düzeyleri içeren 3 BRAF V600E mutant FFPET örneğinin her birinden alınan kırk sekiz ayrı 5 µm'lik kesit, DNA izolasyonu için 3 **cobas**® DNA Sample Preparation Kit lotu kullanılarak ayrı ayrı işlenmiştir. Melaninin test üzerindeki etkisini değerlendirmek için, bir örneğin (%6 mutasyon) melanin konsantrasyonu yüksek olmuştur. Tablo 5 içinde ayrıntılı şekilde açıklanan 6 panel ögesini içeren bir dizi elde etmek için her bir kesitten DNA'nın seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Tablo 5
FFPET Örneklerinden Dilüsyon Panel Ögelerinin Hazırlanması

FFPET Örneği	Örnek Bilgileri		Dilüsyon Panel Ögelerindeki DNA Miktarı (ng/25 µL)
	Ortalama % V600E Mutasyonu*	Pigmentasyon	
Örnek 1	%6	Yüksek Düzeyde Pigmente**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Örnek 2	%12	NHP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Örnek 3	%4	NHP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* 454 sekanslama ile tayin edilen örneğin ortalama mutasyon yüzdesi

** Görsel değerlendirmeye göre yüksek düzeyde pigmente, Melanin konsantrasyonu = 0,17 µg/25 µL

*** NHP = Görsel değerlendirmeye göre Yüksek Düzeyde Pigmente Değil

Her bir panel ögesinden on altı (16) tekrar, 3 **cobas** BRAF Test kit lotunun her biri (n = 48/panel ögesi) kullanılarak çalıştırılmıştır. Her bir FFPET örneği için hassasiyet, en az %95 BRAF V600E “Mutasyon Saptandı” oranı veren (gölgeli alanlar) en düşük DNA miktarı ile tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçları Tablo 6 içinde gösterilmiştir.

Tablo 6
FFPET Örnekleri ile cobas BRAF Test hassasiyeti

FFPET Örneği	454 Sekanslama ile Mutasyon Yüzdesi	Panel Ögesindeki DNA Miktarı	“Mutasyon Saptandı” Oranı (n = 48)
Örnek 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
Örnek 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
Örnek 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

Çalışma, **cobas** BRAF Test ile 125 ng/25 µL standart girdi kullanılarak ≥ %5 mutasyon düzeyinde gerçek klinik FFPET örneklerinde BRAF V600E mutasyonu saptanabildiğini göstermiştir. Testin daha düşük DNA girdisi düzeylerinde mutasyonu saptayabilme kapasitesi, örneklerin fiksasyon işleminden bozunmuş DNA içerebileceğini ve yine de saptanabileceğini göstermektedir. Çalışmaya dahil edilen bir adet yüksek düzeyde pigmente örneğin testin hassasiyetini etkilemediği görülmüştür.

Hücre Soyu Karışımı ile Analitik Hassasiyet

İki melanom hücre soyundan [SK-MEL 28 (BRAF V600E mutant) ve SK-MEL 2 (BRAF yabanıl tip)] DNA stokları, 454 sekanslama ile doğrulanmış %5 mutasyon düzeyinde bir örnek elde etmek üzere karıştırılmıştır. 125 ng/25 µL'den sıfır ng/25 µL'ye kadar DNA içeren üç ayrı dilüsyon paneli hazırlanmıştır. Her bir panel ögesinden yirmi (20) tekrar, 3 **cobas** BRAF Test kit lotunun her biri (n = 60/panel ögesi) kullanılarak çalıştırılmıştır. Hassasiyet, en az %95 BRAF V600E “Mutasyon Saptandı” oranı veren (gölgeli alanlar) en düşük DNA miktarı ile tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçları Tablo 7 içinde gösterilmiştir.

Tablo 7
Hücre Soyu Karışımı ile cobas BRAF Test hassasiyeti

Hücre Soyu Karışımı	454 Sekanslama ile Ortalama Mutasyon Yüzdesi	Panel Ögesindeki DNA Miktarı	“Mutasyon Saptandı” Oranı (n = 60)
Hücre Soyu Karışımı	%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

cobas BRAF testi, önerilen 125 ng/25 µL DNA girdisinin 1:32 dilüsyonunu temsil eden 3,9 ng/25 µL'de %95 “Mutasyon Saptandı” oranı vermiştir. Bu durum, DNA'nın ~%97'si fiksasyon işlemi nedeniyle bozunmuş olduğunda, hücre soyu DNA'sının %100 intakt ve amplifikasyona tabi tutulabilir DNA içerdiği varsayılarak testin BRAF V600E mutasyonunu saptayacağını göstermektedir.

Genomik Girdi Aralığı:

cobas BRAF Test için önerilen DNA girdisi 125 ng'dir. Farklı genomik DNA girdisi miktarları, bozulan DNA miktarındaki varyasyondan ve/veya DNA kantitasyonundaki hatalardan kaynaklanabilir. Farklı genomik DNA girdisi miktarlarının etkilerini değerlendirmek için, mutasyon durumu ve pigmentasyon düzeyi için seçilen 11 melanom FFPET örneğinden genomik DNA ekstrakte edilmiş ve 250 ng, 125 ng, 62,5 ng ve 31,3 ng/25 µL'yi temsil eden örnek girdisi ile seri şekilde seyreltilmiştir. 4 DNA düzeyinin tamamı, 2 lot kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm genomik DNA girdisi düzeyleri için beklenen sonuçlar elde edilmiştir.

Minimal Tümör İçeriği

Otuz üç (33) BRAF V600E mutant örneği, makrodisseksiyon olmadan %5 ila %50 arasında tümör içeriğine sahip örneklerde BRAF V600E mutasyonunu saptamak için gerekli minimum tümör oranını tayin etmek üzere test edilmiştir. Her bir örnekten bir (1) kesit, **cobas** BRAF Test kullanılarak test edilmiştir.

cobas BRAF Test, minimum tümör içeriği Tablo 8 içinde gösterildiği üzere en az %15 olduğunda minimum % mutant DNA düzeyi %5'in üzerinde olan BRAF V600E mutant örneklerinin tamamını doğru saptamıştır. %15'ten az tümör içeriğine ve %5'ten düşük mutasyon düzeyine sahip örnekler, mutasyon saptanmadı olarak bildirilmiştir. Ayrıca, önerilen 125 ng/25 µL DNA girdisi konsantrasyonunda, tümör içeriği %5 ila %45 arasında değişen ek 24 yabanıl tip örnek test edilmiştir. Tüm yabanıl tip örnekler doğru şekilde saptanmıştır. Alana göre < %50 tümör içeriği bulunan örnekler için makrodisseksiyon gereklidir.

Tablo 8

33 BRAF V600E Örneğinin Çeşitli Yüzdelerde Tümör İçeriği ve Mutasyon Yüzdesi ile Test Edilmesinin Sonuçları

Örnek Sayısı	Tümör İçeriği*	% Mutasyon	Test sonucu
1	%5 / %5	%3	Mutasyon Saptanmadı
2	%5 / %5	%5	Mutasyon Saptanmadı
3	%5 / %5	%1	Mutasyon Saptanmadı
4	%10 / %10	%4	Mutasyon Saptanmadı
5	%10 / %10	%14	Mutasyon Saptandı
6	%15 / %10	%6	Mutasyon Saptandı
7	%15 / %15	%23	Mutasyon Saptandı
8	%15 / %15	%3	Mutasyon Saptandı
9	%15 / %15	%29	Mutasyon Saptandı
10	%15 / %15	%14	Mutasyon Saptandı
11	%15 / %15	%14	Mutasyon Saptandı

Örnek Sayısı	Tümör İçeriği*	% Mutasyon	Test sonucu
12	%15 / %20	%5	Mutasyon Saptandı
13	%20 / %20	%28	Mutasyon Saptandı
14	%20 / %20	%2	Mutasyon Saptandı
15	%25 / %20	%13	Mutasyon Saptandı
16	%25 / %25	%25	Mutasyon Saptandı
17	%30 / %25	%20	Mutasyon Saptandı
18	%30 / %30	%10	Mutasyon Saptandı
19	%30 / %35	%4	Mutasyon Saptandı
20	%30 / %35	%17	Mutasyon Saptandı
21	%35 / %30	%8	Mutasyon Saptandı
22	%35 / %35	%7	Mutasyon Saptandı
23	%35 / %35	%12	Mutasyon Saptandı
24	%35 / %35	%22	Mutasyon Saptandı
25	%35 / %40	%36	Mutasyon Saptandı
26	%40 / %35	%7	Mutasyon Saptandı
27	%40 / %35	%12	Mutasyon Saptandı
28	%40 / %40	%14	Mutasyon Saptandı
29	%40 / %40	%21	Mutasyon Saptandı
30	%40 / %40	%28	Mutasyon Saptandı
31	%40 / %45	%36	Mutasyon Saptandı
32	%45 / %45	%10	Mutasyon Saptandı
33	%50 / %40	%8	Mutasyon Saptandı

* Örneğin tümör içeriği, bir patoloji uzmanı tarafından her bir örneğin on iki bitişik 5 µm'lik kesitinin birincisi ve sonuncusu incelenerek değerlendirilmiştir. İlk ve son kesitin tümör içeriği gösterilir (örneğin, %95/%95).

Çapraz Reaktivite

cobas BRAF Test için çapraz reaktivite, aşağıdaki örnek tiplerinin test edilmesi ile değerlendirilmiştir;

- Çeşitli mutasyon düzeylerinde BRAF V600E dışı mutant melanom FFPET örnekleri,
- BRAF V600E dışı mutasyon plazmidleri,
- BRAF homolog plazmidleri,
- Ciltle ilgili mikroorganizmalar.

Çapraz reaktivite, ayrıca BRAF homolog plazmidlerinin veya ciltle ilgili mikroorganizmaların BRAF V600E mutasyonunun saptanmasına engel olup olmadığı belirlenerek de değerlendirilmiştir.

BRAF V600E Dışı Melanom FFPET Örnekleri

BRAF V600E dışı mutasyonlar (V600D, V600E2, V600R veya V600K) bulunan on dört (14) melanom FFPET örneği, üçlü halde **cobas** BRAF Test ile test edilmiştir. BRAF V600E dışı örneklerin sekizinde, üç tekrarı tamamı **cobas** BRAF Test ile çapraz reaktivite göstermiştir. Bu sekiz örnek; BRAF V600D mutant (%18 mutasyon), BRAF V600E2 mutant (%68 mutasyon) veya BRAF V600K mutant (%30'un üzerinde mutasyon) olmuştur. Tablo 9'da gösterildiği üzere, BRAF V600R mutant (%23 mutasyon) örnek için çapraz reaktivite gözlenmemiştir.

Tablo 9

cobas BRAF Test ile FFPET Örneklerinde BRAF V600E Dışı Mutasyonlar için Gözlenen Mutasyon Saptandı Oranları

Örnek Sayısı	BRAF Mutasyon Durumu	Mutasyon Yüzdesi	Tümör İçeriği*	Tümör Evresi	"Mutasyon Saptandı" Oranı (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

* Örneğin tümör içeriği, bir patoloji uzmanı tarafından her bir örneğin on iki bitişik 5 µm'lik kesitinin birincisi ve sonuncusu incelenerek değerlendirilmiştir. İlk ve son kesitin tümör içeriği gösterilir (örneğin, %95/%95).

DNA konsantrasyonları 5,0 ng/µL'den 0,0049 ng/µL'ye kadar değişen (test için 25 µL girdi hacminde 125 ila 0,1 ng arasında DNA'ya karşılık gelir) on bir ögeli bir dilüsyon paneli hazırlanmış ve her bir panel ögesi, **cobas** BRAF Test ile çapraz reaksiyona girdiği bulunan sekiz örnek için %100 Mutasyon Saptandı Oranı veren en düşük DNA miktarını tayin etmek üzere üçlü şekilde test edilmiştir. Çapraz reaktivitede kayıptan önce en düşük DNA girdisi düzeyinin, %69 mutasyonlu BRAF V600K mutant örneği için 0,5 ng/25 µL ile %18 mutasyonlu BRAF V600D mutant örneği için 15,6 ng/25 µL arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10

cobas BRAF Testinin Çapraz Reaktivite Saptayabilmesi için En Düşük DNA Girdisi

Örnek Sayısı	BRAF Mutasyon Durumu	Mutasyon Yüzdesi	Çapraz Reaktivite Kaybından Önce En Düşük DNA Girdisi Miktarı (n = 3)
1	V600D	%18	15,6 ng/25 µL
2	V600E2	%68	7,8 ng/25 µL
3	V600K	%31	3,9 ng/25 µL
4		%35	3,9 ng/25 µL
5		%39	3,9 ng/25 µL
6		%36	2,0 ng/25 µL
7		%62	3,9 ng/25 µL
8		%69	0,5 ng/25 µL

BRAF V600E Dışı Plazmidler

Aşağıdaki dokuz BRAF V600E dışı mutasyon için yabancı tip plazmid arka planında %5 ila %75 arasında değişen mutasyon düzeylerine sahip plazmid dilüsyon panelleri hazırlanmıştır: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K ve V600R. Her bir plazmid için hazırlanan dilüsyon panellerinin her bir ögesinin üçlü tekrarı, **cobas** BRAF Test kullanılarak test edilmiştir. Çapraz reaktivite, ≥ %10 mutasyonda BRAF V600D plazmid, ≥ %35 mutasyonda BRAF V600K plazmid ve ≥ %65 mutasyonda BRAF V600E2 plazmid için 3 tekrarı tamamında görülmüştür. Test edilen diğer altı BRAF mutasyonlu plazmidlerde çapraz reaktivite gözlenmemiştir.

BRAF Homolog Plazmidleri

Tablo 11 içinde belirtildiği üzere üç BRAF homolog plazmid (BRAF Psödogen, ARAF ve RAF1), BRAF V600E mutant plazmid ve BRAF yabancı tip plazmid için örnekler hazırlanmıştır. Her bir panel üyesinden üç ila sekiz tekrar, **cobas** BRAF Test kullanılarak test edilmiştir.

Tablo 11
BRAF Homolog Plazmid Örnekleri

Panel		Hacme Göre Bileşim	
Adı	Öge	Bileşen 1	Bileşen 2
BRAF Psödogen	1	%95 BRAF Psödogen	%5 BRAF V600E Mutant
	2	%100 BRAF Psödogen	- - -
ARAF	1	%95 ARAF	%5 BRAF V600E Mutant
	2	%100 ARAF	- - -
RAF1	1	%95 RAF1	%5 BRAF V600E Mutant
	2	%100 RAF1	- - -
Kontrol	1	%95 BRAF Yabancı tip	%5 BRAF V600E Mutant
	2	%100 BRAF Yabancı tip	- - -
	3	%95 DNA Elüsyon Tamponu	%5 BRAF V600E Mutant

Test edilen üç BRAF homolog plazmidin hiçbiri, tek başına test edildiğinde **cobas** BRAF Test ile saptanmamıştır. Bu durum, BRAF homolog plazmidlerinin test ile çapraz reaksiyona girmediğine işaret etmektedir.

%95 BRAF homolog plazmid varlığında %5 düzeyinde BRAF V600E Mutant plazmid, her durumda beklenen “Mutasyon Saptandı” sonucunu vermiştir. Bu durum, homolog plazmidlerin BRAF V600E mutasyonunun saptanmasına engel olmadığına işaret etmektedir.

Ciltle ilgili mikroorganizmalar

Aşağıdaki ciltle ilgili mikroorganizmaların, doku lizis adımı sırasında 1×10^6 koloni oluşturabilen birim (CFU) düzeyinde yabancı tip melanom FFPET örneğine eklendiğinde, **cobas** BRAF Test'te çapraz reaksiyon gerçekleştirmediği bulunmuştur:

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

Test edilen mikroorganizmalar, ayrıca, doku lizis adımı sırasında 1×10^6 koloni oluşturabilen birim (CFU) eklendiğinde, %8 BRAF V600E mutasyonu ile FFPET örneğinin saptanmasına engel olmamıştır.

İnterferans

Trigliseritler (≤ 74 mM, $2 \times$ CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon¹⁷), hemoglobin (≤ 2 mg/mL, $1 \times$ CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon¹⁷) ve $\leq$ %95 nekrotik doku, örnek hazırlama prosedürü sırasında lizis adımına potansiyel etkileşimde bulunan madde eklendiğinde **cobas** BRAF Test ile etkileşime girmemiştir.

Melanin

Yüksek konsantrasyonlarda endojen melaninin etkisi, yüksek düzeyde pigmente melanom FFPET örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Pigmentasyon düzeylerine göre toplamda 41 benzersiz FFPET melanom tümör dokusu örneği seçilmiştir: Karşılaştırma amacıyla bunların 33'ü yüksek düzeyde pigmente olmuş, 3'ü Afrikalı Amerikalı bireylerden alınmış ve 5'i hafif düzeyde pigmente olmuştur. DNA dokudan ekstrakte edilmiş ve her bir örnek için melanin konsantrasyonu belirlenmiştir. 41 örneğin her birinden elde edilen iki kesitin her birinden DNA stokunun tek bir tekrarı test edilmiştir. Üç örnek geçersiz sonuçlar vermiştir. Bir örnek, “Mutasyon Saptanmadı” sonucu vermiş, ancak bu örneğin saptama limitinin altında olduğu belirlenmiştir. “Geçersiz” sonuçları olan 3 örnek, önerilen DNA konsantrasyonunu ve 125 ng/PCR önerilen DNA girdisinin iki kat, dört kat ve sekiz kat dilüsyonlarını hazırlamak amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen seyreltilmiş DNA örnekleri (25 µL'de toplam 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng veya 15,6 ng DNA içeren), dilüsyon ile melaninde ilgili azaltımın geçerli sonuç elde edilmesini sağlayıp sağlamadığını belirlemek üzere yeniden test edilmiştir. Üç örneğin tamamı, 2 kat seyreltilindiğinde doğru sonuçlar vermiştir.

Tablo 12
Pigmente Melanom FFPE Örnekleri ile cobas BRAF Test Performansının Özeti

Örnek Kimliği	Dilüsyon	Örnekteki/PCR'deki melanin miktarı	Sonuç
1	Yok (125 ng)	0,15 µg	Geçersiz/Geçersiz
	İki kat (62,5 ng)	0,08 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
	Dört kat (31,3 ng)	0,04 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
	Sekiz kat (15,6 ng)	0,02 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
2	Yok (125 ng)	0,24 µg	Geçersiz/Geçersiz
	İki kat (62,5 ng)	0,12 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
	Dört kat (31,3 ng)	0,06 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptanmadı
	Sekiz kat (15,6 ng)	0,03 µg	Mutasyon Saptanmadı/Geçersiz
3	Yok (125 ng)	0,34 µg	Geçersiz/Geçersiz
	İki kat (62,5 ng)	0,17 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
	Dört kat (31,3 ng)	0,08 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı
	Sekiz kat (15,6 ng)	0,04 µg	Mutasyon Saptandı/Mutasyon Saptandı

17 yabanıl tip örneğin test edilmesinden elde edilen sonuçlar, yanlış pozitif sonuçlar veren 2 yüksek düzeyde pigmente örnek hariç olmak üzere, örneklerin tamamına “Mutasyon Saptanmadı” sonucunun doğru şekilde atandığını göstermiştir.

KLİNİK PERFORMANS

Tekrar üretilebilirlik

3 harici test tesisinde (tesis başına 2 operatör), 3 reaktif lotunda ve 5 ardışık olmayan test gününde, malign melanomun FFPE kesitlerinden elde edilen DNA örneklerinin 8 ögeli paneli ile **cobas** BRAF Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu panel, hem pigmente hem de pigmente olmayan örnekler ile birlikte, %5 saptama limitinde (LoD) bir örnek dahil olmak üzere, belirli bir aralıkta tümör içeriği yüzdesi ve mutant allel yüzdesi içermiştir. 94 çalışmanın 92'si (%97,9) geçerli olmuştur. Test edilen 1442 örneğin 2'si (%0,14) geçersiz sonuçlar vermiştir. LoD örnekler dışındaki panel ögelerinin tamamında, %20 mutasyonlu örnek panel ögeleri ve yüksek düzeyde pigmente olduğu belirlenen iki panel ögesi dahil olmak üzere, geçerli testlerin %100'ü için doğru değerlendirme sağlanmıştır. LoD panel ögesi için, örneklerin %90'ında (162/180) V600E mutasyonu saptanmıştır. Test edilen hiçbir WT örneğinde yanlış pozitif sonuç elde edilmemiştir. Özetle, **cobas**® BRAF Test, hem pigmente hem de pigmente olmayan örneklerde, düşük tümör içeriğine ve düşük mutant allel yüzdesine sahip örneklerde ve test tesisleri, operatörler, reaktif lotları ve test günleri arasında yüksek oranda tekrar üretilebilir olmuştur. Analitik özgüllük %100 olmuştur.

Faz III Klinik Araştırma Örnekleri için Referans Yöntem ile Korelasyon

Faz III klinik araştırmada V600E mutasyonunun prevalansı, **cobas** BRAF Test ile elde edilen sonuca göre %46,5 olmuştur. Bu değer, literatürde bildirilen melanom hastalarındaki V600E prevalansı ile tutarlıdır.

2 × iki yönlü Sanger sekanslama ile karşılaştırma yaparak **cobas** BRAF Test performansını değerlendirmek için, klinik, demografik ve Sanger sekanslama verilerinin toplandığı, Faz III vemurafenib araştırması için taranan 596 ardışık hasta tanımlanmıştır. Bu vakaların 94'ü dahil edilme kriterleri eksik olduğundan uygun olmamış, 4 vakada patolojik inceleme eksik olmuş ve 2 vakada geçersiz **cobas** BRAF Test sonuçları elde edilmiştir. Kalan 496 uygun vakadan 47 örnekte geçersiz Sanger sekanslama sonuçları elde edilmiş ve geriye 449 değerlendirilebilir vaka kalmıştır. **cobas** BRAF Test sonuçları ve Sanger sekanslama sonuçları arasında V600E mutasyonunun saptanması açısından uyum analizi, aşağıda Tablo 13 içinde gösterilmiştir.

Tablo 13
cobas BRAF Test Sonuçları ile Sanger Sekanslama Sonuçlarının Karşılaştırılmasının Özeti

cobas BRAF Test (Test Yöntemi)	Sanger Sekanslama (Referans Yöntem)		
	BRAF V600E Mutasyon Saptandı^a	BRAF V600E Mutasyon Saptanmadı^b	Toplam
Mutasyon Saptandı	216	35	251
Mutasyon Saptanmadı	6	192	198
Toplam	222	227	449
Pozitif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 216/222 = \%97,3$ (%94,2, %98,8)		
Negatif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 192/227 = \%84,6$ (%79,3, %88,7)		
Genel uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 408/449 = \%90,9$ (%87,8, %93,2)		

^a Mutasyon Saptandı, Sanger ile belirlendiği üzere ağırlıklı BRAF mutasyon tipi V600E'nin (1799 T > A) varlığına işaret eder.

^b Mutasyon Saptanmadı, Sanger ile belirlendiği üzere ağırlıklı BRAF mutasyon tipi V600E'nin yokluğuna işaret eder (yani yabancı tip mutasyon ya da mutasyon yok, V600D, V600E2, V600K, V600R ve Diğer Mutasyonlar).

Not: Hem **cobas** BRAF Test hem de Sanger sekanslamadan geçerli eşleşen sonuçları olan melanom örnekleri.

Not: GA = (skor) güven aralığı.

Uyumsuz **cobas** BRAF Test ve Sanger sekanslama sonuçları veren 41 örneğin tamamı, ikinci referans yöntemi olarak 454 sekanslamaya (kantitatif masif paralel pirosekanslama) tabi tutulmuştur. Ek olarak, 33 **cobas** BRAF Test ve Sanger sekanslama ile uyumlu örnek, 454 sekanslama ile test edilmiştir. Uyumsuz çözümlemenin ardından ikincil uyum analizi Tablo 14 içinde sunulmuştur.

cobas BRAF Test uyarınca Mutasyon Saptanmadı ve Sanger sekanslama uyarınca V600E sonucu olan 6 uyumsuz örneğin 5/6'sında, 454 sekanslama ile yabancı tip sonucu elde edilmiştir (bir örnekte geçersiz 454 sonucu elde edilmiştir).

cobas BRAF Test uyarınca Mutasyon Saptandı ve Sanger sekanslama uyarınca WT sonucu olan 8/35 uyumsuz örneğin 7/8'inde, 454 sekanslama ile V600E mutasyonu saptanmıştır (bir örnekte geçersiz 454 sonucu elde edilmiştir).

cobas BRAF Test uyarınca Mutasyon Saptandı ve Sanger sekanslama uyarınca V600E dışı sonucu olan 27/35 uyumsuz örneğin 24'ünde, 454 sekanslama ile V600K mutasyonu, birinde V600E2 ve birinde V600E saptanmıştır. 1 örnekte, Sanger, V600D mutasyonu saptamış ve 454 sekanslama, yabancı tip sonucu vermiştir.

V600K için **cobas** BRAF Test'in çapraz reaktivitesi %66 (25/38) olmuştur.

454 sekanslama ile uyum, 33 **cobas** BRAF Test ve Sanger sekanslama ile uyumlu V600E ve WT örneği için %100 olmuştur.

Tablo 14
454 Sekanslama ile Uyumsuz Çözümleme Sonrası cobas BRAF Test Sonuçları ve Sanger Sekanslama

cobas BRAF Test (Test Yöntemi)	454 Sekanslama ile Uyumsuz Çözümleme Sonrası		
	BRAF V600E Mutasyon Saptandı	BRAF V600E Mutasyon Saptanmadı	Toplam
Mutasyon Saptandı	224	27	251
Mutasyon Saptanmadı	1	197	198
Toplam	225	224	449
Pozitif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 224/225 = \%99,6$ (%97,5, %99,9)		
Negatif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 197/224 = \%87,9$ (%83,0, %91,6)		
Genel uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 421/449 = \%93,8$ (%91,1, %95,7)		

BRAF 600. Kodon Mutasyonlarının Dağılımı

600. kodon mutasyonlarının dağılımı, 496 uygun vakada, Sanger ve 454 sekanslama sonuçlarının birleşimine göre tayin edilmiştir. 496 vakanın 182'si yabani tip ve 314'ü mutant olmuştur. 600. kodon mutasyonlarının 314 mutasyon pozitif vakadaki dağılımı, Tablo 15 içinde gösterilmiştir. V600K mutasyonları, 600. kodon mutasyonları bulunan tüm vakaların %13,4'ünde tanımlanmıştır.

Tablo 15

Sanger ve/veya 454 Sekanslama ile Belirlendiği Üzere Mutasyon Pozitif Popülasyonda BRAF 600. Kodon Mutasyonlarının Dağılımı

Aminoasit Sekansı (600. Kodon)	Nükleotid Sekansı (1798–1800)	N	% Dağılım
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
Toplam 600. kodon mutantları		314	100
Toplam 600. kodon yabani tip		182	---

ZELBORAF®'in (vemurafenib) Klinik Etkililiği^a

cobas BRAF Test, ZELBORAF® ile tedavi için hasta seçiminde birlikte uygulanan bir test olarak kullanılmıştır. ZELBORAF®'in klinik güvenliliği ve etkililiği, dakarbazin'e (standart tedavi) kıyasla ZELBORAF®'in klinik etkililiğini değerlendirmek üzere V600E BRAF mutasyonu bulunan, rezeke edilemeyen evre IIIC veya evre IV melanomlu, daha önceden tedavi uygulanmamış hastalarla gerçekleştirilen uluslararası, randomize, açık etiketli, kontrollü, çok merkezli bir Faz III çalışma olan NO25026 çalışmasında (BRIM3) kanıtlanmıştır. Tedavi için değerlendirilen tüm melanomlu hastalardan alınan FFPET örnekleri, **cobas** BRAF Test ile test edilmiştir. "Mutasyon Saptandı" test sonucu olan hastalar, diğer uygunluk kriterlerini de karşılamaları halinde ilaç araştırmasına kaydedilmeye uygun olmuştur. "Mutasyon Saptanmadı" test sonucu olan hastalar, ilaç araştırmasına kaydedilmeye uygun olmamıştır. Çalışma, dünya genelinde yaklaşık 104 tesiste (ABD'de 22 merkez) yürütülmüştür.

Araştırmaya 675 hasta kaydedilmiştir. Bunların 337'si vemurafenib, 338'i ise dakarbazin almak üzere atanmıştır. Araştırmanın temel etkililik sonucu ölçütleri, genel sağkalım (OS) ve araştırmacı tarafından değerlendirilen ilerlemesiz sağkalım (PFS) olmuştur. Diğer sonuç ölçütleri, doğrulanmış araştırmacı tarafından değerlendirilen en iyi genel yanıt oranını içermiştir.

Başlangıç özellikleri, tedavi grupları arasında dengeli olmuştur. Hastaların çoğu erkek (%56) ve Beyaz (%99) olmuş, medyan yaş ise 54 (hastaların %24'ü ≥ 65 yaşında) olmuştur. Tüm hastaların ECOG performans durumu 0 veya 1 olmuş ve hastaların çoğunda metastatik hastalık mevcut olmuştur (%95).

Araştırmadan edinilen etkililik sonuçları, aşağıda Tablo 16 ve Şekil 2 içinde gösterilmiştir:

Tablo 16

Vemurafenib'in BRAF V600E Mutasyon Pozitif Melanomlu, Daha Önceden Tedavi Uygulanmamış Hastalardaki Etkililiği^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dakarbazin (N = 338)	p değeri^d
Genel Sağkalım			
Ölüm Sayısı	78 (%23)	121 (%36)	-
Risk Oranı (%95 GA) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Medyan Sağkalım (ay) (%95 GA) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Medyan Takip (ay) (aralık)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
İlerlemesiz sağkalım Risk Oranı (%95 GA) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Medyan PFS (ay) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a **cobas** BRAF Test ile saptandığı üzere

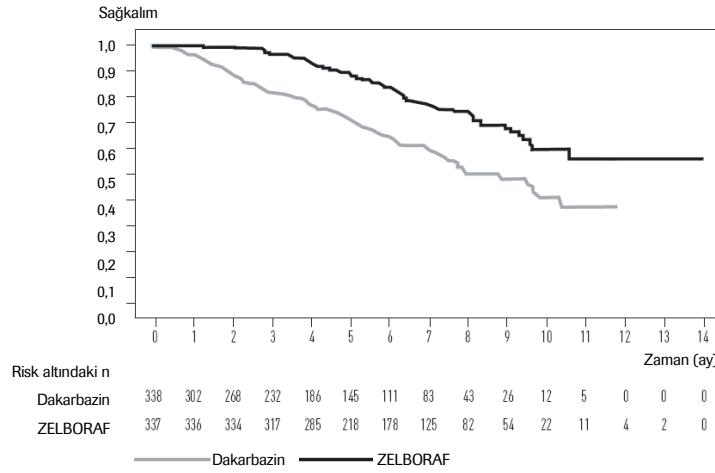
^b Cox modeli kullanılarak tahmin edilen risk oranı; < 1 risk oranı vemurafenib lehinedir

^c Kaplan-Meier tahmini

^d Kategorilendirilmemiş log-sıra testi

^e Ulaşılmadı

Şekil 2
Kaplan-Meier Genel Sağkalım Eğrileri – Tedavi Uygulanmamış Hastalar



Doğrulanmış, araştırmacı tarafından değerlendirilen en iyi genel yanıt oranı, dakarbazin kolunda %5,5'e (%95 GA: %2,8, %9,3) kıyasla ZELBORAF® kolunda %48,4 (%95 GA: %41,6, %55,2) olmuştur.

COTELLIC®'in (kobimetinib) Klinik Etkililiği^{10, 11}

MEK inhibitörü olan COTELLIC®, bir klinik araştırmada (coBRIM) ZELBORAF® ve plaseboya kıyasla ZELBORAF® ile kombinasyonda test edilmiştir. Hastaların bu klinik araştırmaya kaydedilmeye uygunluğunu belirlemek için **cobas** BRAF Test kullanılmıştır. COTELLIC® ve ZELBORAF® kombinasyonunun güvenliliği ve etkililiği, BRAF V600 mutasyonu pozitif, rezeke edilemeyen veya metastatik melanomlu, daha önceden tedavi uygulanmamış 495 hastada gerçekleştirilen çok merkezli, randomize (1:1), çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada belirlenmiştir. Temel etkililik sonucu ölçütü, RECIST v1.1 uyarınca araştırmacı tarafından değerlendirilen ilerlemesiz sağkalım (PFS) olmuştur. Ek etkililik sonuçları arasında araştırmacı tarafından değerlendirilen onaylanmış objektif yanıt oranı (ORR), genel sağkalım (OS), körlenmiş bağımsız merkezi inceleme yoluyla değerlendirildiği üzere PFS ve yanıt süresi (DOR) yer almıştır.

Başlangıç özellikleri, tedavi grupları arasında dengeli olmuştur. Hastaların çoğu erkek (%58) ve Beyaz (%93) olmuş, medyan yaş ise 55 olmuştur. Hastaların %72'sinin ECOG performans durumu 0 olmuş ve %60'ında evre M1c hastalık mevcut olmuştur.

Tedavi için değerlendirilen tüm hastalardan alınan FFPET örnekleri, **cobas** BRAF Test ile test edilmiştir. “Mutasyon Saptandı” sonucu olan hastalar, diğer uygunluk kriterlerini de karşılamaları halinde araştırmaya kaydedilmeye uygun olmuştur. “Mutasyon Saptanmadı” sonucu olan hastalar, araştırmaya kaydedilmeye uygun olmamıştır. Araştırma, **cobas** BRAF Test ile saptandığı üzere BRAF V600K mutasyonları olan hastaları içermiştir. Bu durum, V600K içeren tümörleri bulunan hasta popülasyonunun saptanan kısmında terapötik ürün güvenliliğini ve etkililiğini kanıtlamıştır.

Araştırmadan edinilen etkililik sonuçları, aşağıda Tablo 17 ve Şekil 3 içinde gösterilmiştir:

Tablo 17

BRAF Mutasyon Pozitif Melanomlu Hastalarda Vemurafenib ile Kombinasyon Halinde Kobimetinib'in Etkililiği^a

	Kobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Plasebo + Vemurafenib (N = 248)	p değeri
İlerlemesiz sağkalım (Araştırmacı tarafından değerlendirilir)			
Olay sayısı (%)	143 (%58)	180 (%73)	
İlerleme	131	169	
Ölüm	12	11	
Medyan PFS (ay) (%95 GA)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Risk Oranı (%95 GA) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Genel Sağkalım			
Ölüm Sayısı (%)	79 (%32)	109 (%44)	
Medyan Sağkalım (ay) (%95 GA) ^c	Tahmin edilemez (20,7, Tahmin edilemez)	17,0 (15,0, Tahmin edilemez)	-
Risk Oranı (%95 GA) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektif Yanıt Oranı			
Objektif Yanıt Oranı (%95 GA) ^c	%70 (%64, %75)	%50 (%44, %56)	< 0,001
Tam Yanıt	%16	%10	
Kısmi Yanıt	%54	%40	
Medyan Yanıt Süresi, ay (%95 GA) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a **cobas** BRAF Test ile saptandığı üzere

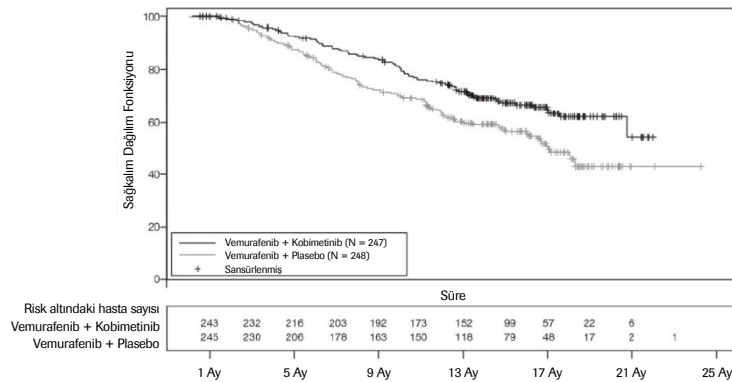
^b Cox modeli kullanılarak tahmin edilen risk oranı; < 1 risk oranı kobimetinib + vemurafenib lehinedir

^c Kaplan-Meier tahmini

^d Kategorilendirilmiş log-sıra testi

^e Bu ara analiz için tahsis edilen 0,019 alfa değeri ile karşılaştırmaya bağlı olarak istatistiksel anlamlılık

Şekil 3
Kaplan-Meier Genel Sağkalım Eğrileri



Randomize edilen hastalardan edinilen mevcut tümör örnekleri, BRAF mutasyonlarını V600E veya V600K şeklinde daha iyi sınıflandırmak için yeni nesil sekanslama (NGS) kullanılarak retrospektif şekilde analiz edilmiştir. Test sonuçları, randomize edilen hastaların %81'inde elde edilmiştir (400/495). NGS'nin başarılı şekilde gerçekleştirildiği bu 400 hastanın 56'sında (%14), BRAF V600K mutasyonları bulunan tümörler, kalan hastalarda ise BRAF V600E mutasyonları mevcut olmuştur. Retrospektif şekilde BRAF V600K mutasyonu içerdiği bulunan 56 tümörde, bu analizde %5,1 ve %36,6 arasında mutasyon sıklığı tespit edilmiştir. Bu araştırmada BRAF V600 mutasyon tipinin belirlendiği hastaların %81'inde bulunan BRAF V600 mutasyon alt tipleri için, PFS, OS ve ORR'ye yönelik keşifsel alt grup analizlerinde vemurafenible birlikte kobimetinib uygulanan kolun lehine bir eğilim gözlenmiştir.

II. PAPİLLER TİROİT KARSİNOMU (PTC)

KLİNİK DIŞI PERFORMANS DEĞERLENDİRMESİ

Aşağıda açıklanan klinik dışı çalışmalarda, % tümör içeriği gibi tümör özellikleri patolojik incelemeye göre değerlendirilmiştir. Test edilecek örnekleri seçmek için iki yönlü Sanger sekanslama kullanılmıştır. % mutasyon düzeyi, 454 sekanslama (kantitatif masif paralel pirosekanslama yöntemi) kullanılarak tayin edilmiştir.

Analitik Hassasiyet

Analitik hassasiyet (Saptama Limiti – LoD)

Denemelerin %95'inde doğru sonuçlar veren minimum DNA girdisi miktarı, iki tür örnekten hazırlanan dilüsyon panelleri kullanılarak değerlendirilmiştir:

- Belirli mutasyon düzeylerine ulaşmak için BRAF V600E mutant FFPET örneklerinden ve BRAF yabanıl tip FFPET örneklerinden elde edilen DNA stoklarının karıştırılması ile hazırlanan örnek karışımları.
- İki BRAF V600E mutant FFPET örneğinden hazırlanan ayrı FFPET DNA stokları.

Bu çalışmada kullanılan tüm örnekler, her bir örneğin mutasyon yüzdesinin tayin edilmesi için 454 sekanslama ile sekanslanmıştır.

Örnek Karışımları ile Analitik Hassasiyet

BRAF V600E mutant FFPET örnek DNA stokları, ~%10 mutasyon düzeyinde bir örnek, ~%5 mutasyon düzeyinde bir örnek ve ~%2 mutasyon düzeyinde bir örnek elde etmek üzere BRAF yabanıl tip FFPET örnek DNA stokları ile karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından, mutasyon düzeyleri 454 sekanslama ile doğrulanmıştır. V600E mutasyonu bulunan üç örnek karışımının her biri, daha sonra Tablo 18 içinde ayrıntılı şekilde belirtilen panel öğelerini elde etmek üzere seyreltilmiştir.

Tablo 18
Örnek Karışımlarından Dilüsyon Panel Öğelerinin Hazırlanması

Karışım	Ortalama % Mutasyon*	Dilüsyon Panel Öğelerindeki DNA Miktarı (ng/25 µL)**
%10 Karışım	%10	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
%5 Karışım	%5	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
%2,5 Karışım	%2	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
%0 (Yalnızca yabanıl tip)	- - -	125

* 454 sekanslama ile test edilen karışımın ortalama mutasyon yüzdesi

** Her bir panel öğesinde yer alan genomik DNA miktarı. 25 µL, testin örnek girdi hacmidir.

Her bir panel ögesinden sekiz (8) tekrar, 3 **cobas** BRAF Test kit lotunun her biri (n = 24/panel ögesi) kullanılarak çalıştırılmıştır. Tablo 19, en az %95 BRAF V600E “Mutasyon Saptandı” oranı veren (gölgeli alanlar) en düşük DNA miktarı ile tayin edilen her bir FFPET karışımının hassasiyetini gösterir.

Tablo 19
FFPET Karışımları ile cobas BRAF Test hassasiyeti

FFPET Karışımı	454 Sekanslama ile Mutasyon Yüzdesi	Panel Ögesindeki DNA Miktarı	“Mutasyon Saptandı” Oranı (n = 24)
%10 FFPET Karışımı	%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 FFPET Karışımı	%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 FFPET Karışımı	%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 (Yabanıl Tip)	- - -	125 ng/25 µL	%0

Bu çalışma, **cobas** BRAF Test ile 125 ng/25 µL standart girdi kullanılarak $\geq$ %5 mutasyon düzeyinde BRAF V600E mutasyonu saptanabildiğini göstermektedir. Testin daha düşük DNA girdisi düzeylerinde mutasyonu saptayabilme kapasitesi, örneklerin fiksasyon işleminden bozunmuş DNA içerebileceğini ve yine de saptanabileceğini göstermektedir. BRAF yabanıl tip örnekler için elde edilen tüm test sonuçları, “Mutasyon Saptanmadı” olmuştur.

FFPET Örnekleri ile Analitik Hassasiyet

Hasta örneklerinde %5 mutasyon saptama iddiasını doğrulamak amacıyla, %6 ve %11 mutasyon düzeyleri içeren iki BRAF V600E mutant FFPET örneğinden alınan yirmi dört ayrı 5 µm'lik kesit, DNA izolasyonu için 3 **cobas**® DNA Sample Preparation Kit lotu kullanılarak ayrı ayrı işlenmiştir. Tablo 20 içinde ayrıntılı şekilde açıklanan 8 panel ögesini içeren bir dizi elde etmek için her bir kesitten DNA'nın seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Tablo 20
FFPET Örneklerinden Dilüsyon Panel Öğelerinin Hazırlanması

	Ortalama % V600E Mutasyonu*	Dilüsyon Panel Öğelerindeki DNA Miktarı (ng/25 µL)
Örnek 1	%6	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Örnek 2	%11	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* 454 sekanslama ile tayin edilen örneğin ortalama mutasyon yüzdesi

Her bir panel ögesinden sekiz (8) tekrar, 3 **cobas** BRAF Test kit lotunun her biri (n = 24/panel ögesi) kullanılarak çalıştırılmıştır. Her bir FFPET örneği için hassasiyet, en az %95 BRAF V600E “Mutasyon Saptandı” oranı veren (gölge alanlar) en düşük DNA miktarı ile tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçları Tablo 21 içinde gösterilmiştir.

Tablo 21
FFPET Örnekleri ile cobas BRAF Test hassasiyeti

FFPET Örneği	454 Sekanslama ile Mutasyon Yüzdesi	Panel Ögesindeki DNA Miktarı	“Mutasyon Saptandı” Oranı (n = 48)
Örnek 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
Örnek 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

Çalışma, **cobas** BRAF Test ile 125 ng/25 µL standart girdi kullanılarak $\geq$ %5 mutasyon düzeyinde gerçek klinik FFPET örneklerinde BRAF V600E mutasyonu saptanabildiğini göstermiştir. Testin daha düşük DNA girdisi düzeylerinde mutasyonu saptayabilme kapasitesi, örneklerin fiksasyon işleminden bozunmuş DNA içerebileceğini ve yine de saptanabileceğini göstermektedir.

Tekrarlanabilirlik

Beş Papiller Tiroit Kanseri FFPET örneği ile **cobas** BRAF Test'in iki reaktif lotu, iki operatör ve dört test günü arasında tekrarlanabilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu FFPET örnekleri; farklı yüzdelerde tümör içeriği (%50 ila %70) ve ~%16–18 mutasyonda iki V600E mutant örnek dahil olmak üzere (yaklaşık $3 \times \text{LoD}$), farklı yüzdelerde mutant allel (%16 ila %22) içermiştir. Doğru değerlendirme, test edilen örneklerin %100'ü için sağlanmıştır (80/80). Test edilen hiçbir WT örneğinde yanlış pozitif sonuç elde edilmemiştir. Özetle, **cobas** BRAF Test, düşük tümör içeriğine ve düşük mutant allel yüzdesine sahip örneklerde ve operatörler, reaktif lotları ve test günleri arasında yüksek oranda tekrarlanabilir olmuştur.

Referans Yöntem ile Korelasyon

2 × iki yönlü Sanger sekanslama ile karşılaştırma yaparak **cobas** BRAF Test performansını değerlendirmek için, 159 PTC FFPET örneği için Sanger sekanslama verileri toplanmıştır. **cobas** BRAF Test sonuçları ve Sanger sekanslama sonuçları arasında V600E mutasyonunun saptanması açısından birincil uyum analizi, test edilen iki reaktif lotundan biri için aşağıda Tablo 22 içinde gösterilmiştir. Mutasyon Saptanmadı sonucu veren bir örnek dışında, ikinci lot da benzer sonuçlar vermiştir. 454 sekanslama ile çözümleme, örneğin %1,4 mutasyon içerdiğini ve **cobas** BRAF Test için %5 hassasiyet beyanının altında olduğunu belirlemiştir.

Tablo 22
cobas BRAF Test Sonuçları ile Sanger Sekanslama Sonuçlarının Karşılaştırılmasının Özeti

cobas BRAF Test (Test Yöntemi)	Sanger Sekanslama (Referans Yöntem)		
	BRAF V600E Mutasyon Saptandı^a	BRAF V600E Mutasyon Saptanmadı^b	Toplam
Mutasyon Saptandı	88	13	101
Mutasyon Saptanmadı	1	57	58
Toplam	89	70	159
Pozitif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 88/89 = \%98,9$ (%93,9, %99,8)		
Negatif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 57/70 = \%81,4$ (%70,8, %88,8)		
Genel uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 145/159 = \%91,2$ (%85,8, %94,7)		

^a Mutasyon Saptandı, Sanger ile belirlendiği üzere ağırlıklı BRAF mutasyon tipi V600E'nin (1799 T > A) varlığına işaret eder.

^b Mutasyon Saptanmadı, Sanger ile belirlendiği üzere ağırlıklı BRAF mutasyon tipi V600E'nin yokluğuna işaret eder (yani yabancı tip mutasyon ya da mutasyon yok ve Diğer Mutasyonlar).

Not: GA = (skor) güven aralığı.

Uyumsuz **cobas** BRAF Test ve Sanger sekanslama sonuçları veren örneklerin tamamı, ikinci referans yöntemi olarak 454 sekanslamaya (kantitatif masif paralel pirosekanslama) tabi tutulmuştur. Uyumsuz çözümlemenin ardından ikincil uyum analizi Tablo 23 içinde sunulmuştur.

Uyumsuz bir örnekte, **cobas** BRAF Test ile Mutasyon Saptanmadı sonucu ve Sanger sekanslama ile V600E sonucu elde edilmiştir. 454 sekanslama, **cobas** BRAF Test ile uyumlu yabancı tip sonucu vermiştir.

cobas BRAF Test ile saptanan mutasyonu bulunan ve Sanger sekanslama uyarınca yabancı tip olan on üç uyumsuz örneğin on ikisinde, 454 sekanslama, **cobas** BRAF Test ile uyumlu şekilde V600E mutasyonu göstermiştir (%1,2 ila %19 allel sıklığı).

cobas BRAF Test uyarınca V600E Mutasyon Saptandı durumundaki kalan bir uyumsuz örnek, Sanger sekanslama ile ve 454 sekanslama ile yabancı tip olmuştur. Daha sonra gerçekleştirilen ek 454 sekanslama incelemesi, örneğin düşük yüzdeli bir V600E mutantı olduğunu doğrulamıştır.

Tablo 23
454 Sekanslama ile Uyumsuz Çözümleme Sonrası cobas BRAF Test Sonuçları ve Sanger Sekanslama

cobas BRAF Test (Test Yöntemi)	454 Sekanslama ile Uyumsuz Çözümleme Sonrası Sanger Sekanslama		
	BRAF V600E Mutasyon Saptandı	BRAF V600E Mutasyon Saptanmadı	Toplam
Mutasyon Saptandı	101	1	102
Mutasyon Saptanmadı	0	57	57
Toplam	101	58	159
Pozitif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 101/101 = \%100,0$ (%96,3, %100,0)		
Negatif uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 57/58 = \%98,3$ (%90,9, %99,7)		
Genel uyum yüzdesi (%95 GA)	$\%100 \times 158/159 = \%99,4$ (%96,5, %99,9)		

SONUÇ İŞARETLERİNİN LİSTESİ

Sonuç işaretleri Results sekmesinin altında görülebilir. Bir işaretin kaynağı, aşağıda Tablo 24'de belirtildiği şekilde işaret kodunda gösterilir. Tablo 25 kullanıcıyla ilgili tüm sonuç yorumlama işaretlerini listeler.

Tablo 24
İşaret kaynağı

İşaret kodu başlangıcı	İşaret kaynağı	Örnek
M*	Birden çok veya diğer nedenler	M6
R	Sonucun yorumlanması	R200
Z*	Analizör	Z1

* Bkz **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu veya **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı

Tablo 25
Sonuç yorumlama işaretlerinin listesi

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R200	Hata	Mutant kontrol geçersiz.	Çalışmayı tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu aşağıdakilerden birine işaret eder: 1. Mutant kontrol için gözlemlenen bir dirsek değeri, belirlenen eşik altındadır (yani dirsek çok düşük). Bu durum, DNA kontaminasyonu durumunda ya da atipik floresan paterni nedeniyle algoritma hatası halinde meydana gelebilir veya 2. Mutant kontrol için gözlemlenen bir dirsek değeri, belirlenen eşik üstündedir (yani dirsek çok yüksek). Bu durum, 1) çalışma ana karışımının yanlış hazırlanması, 2) çalışma ana karışımını mikro kuyucuk plağının reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası gerçekleşmesi veya 3) mutant kontrolü mikro kuyucuk plağının reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası gerçekleşmesi halinde meydana gelebilir.
R201	Hata	Yabanıl tip kontrol geçersiz.	Çalışmayı tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu aşağıdakilerden birine işaret eder: 1. Yabanıl tip kontrol için gözlemlenen bir dirsek değeri, belirlenen eşik altındadır (yani dirsek çok düşük). Bu durum, DNA kontaminasyonu durumunda ya da atipik floresan paterni nedeniyle algoritma hatası halinde meydana gelebilir veya 2. Yabanıl tip kontrol için gözlemlenen bir dirsek değeri, belirlenen eşik üstündedir (yani dirsek çok yüksek). Bu durum, 1) çalışma ana karışımının yanlış hazırlanması, 2) çalışma ana karışımını mikro kuyucuk plağının reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası gerçekleşmesi veya 3) yabanıl tip kontrolü mikro kuyucuk plağının reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası gerçekleşmesi halinde meydana gelebilir.

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R202	Hata	Mutant Ct saptanmadı.	Örneği tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu, örnek için mutant dirsek değerinin gözlemlenmediğine işaret eder. Bu durum, örnekte mutasyon olmadığına ya da aşağıdakilerden birine ya da daha fazlasına işaret edebilir: 1. Testin saptama limitinin altında olan düşük mutant sekans yüzdesi. 2. Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. 3. İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir. 4. Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır. 5. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar primerlerle ve/veya mutant proba kapatılmıştır. 6. Örnek pipetleme hatası gerçekleşmiş ya da örnek DNA'sı, reaksiyon kuyucuğuna eklenmemiş olabilir.
R203	Hata	Yabanıl tip Ct saptanmadı.	Örneği tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu, örnek için yabanıl tip dirsek değerinin gözlemlenmediğine işaret eder. Yabanıl tip dirsek değerinin olmaması, aşağıdakilerden birini ya da daha fazlasını düşündürür: 1. Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. 2. İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir. 3. Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır. 4. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar primerlerle ve/veya Yabanıl Tip proba kapatılmıştır. 5. Örnek DNA bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir.
R204	Hata	Mutant Ct aralık dışında.	Örneği tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu aşağıdakilerden birine işaret eder: 1. Örnek için gözlemlenen bir mutant dirsek değeri, belirlenen eşik altındadır (yani dirsek çok düşük). Bu durum, PCR karışımına konsantre genomik DNA'nın anlamlı düzeyde aşırı yüklenmesi halinde ya da atipik floresan patern nedeniyle algoritma hatası durumunda meydana gelebilir ya da 2. Örnek için gözlemlenen bir mutant dirsek değeri, belirlenen eşik üstündedir (yani dirsek çok yüksek). Bu durum, aşağıdakilerden birine ya da daha fazlasına işaret edebilir: • Testin saptama limitinin altında olan düşük mutant sekans yüzdesi. • Örnek DNA'sının reaksiyon kuyucuğuna eklenmesinde pipetleme hatası. • Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. • İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir. • Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır. • Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar primerlerle ve/veya mutant proba kapatılmıştır.

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R205	Hata	Yabanıl tip Ct aralık dışında.	Örneği tekrarlayın. Teste özgü kullanma talimatına bakın. Bu işaret kodu aşağıdakilerden birine işaret eder: 1. Örnek için gözlemlenen bir yabanıl tip dirsek değeri, belirlenen eşiğin altındadır (yani dirsek çok düşük). Bu durum, PCR karışımına konsantre genomik DNA'nın anlamlı düzeyde aşırı yüklenmesi halinde ya da atipik floresan patern nedeniyle algoritma hatası durumunda meydana gelebilir ya da 2. Örnek için gözlemlenen bir yabanıl tip dirsek değeri, belirlenen eşiğin üstündedir (yani dirsek çok yüksek). Bu durum, aşağıdakilerden birine ya da daha fazlasına işaret edebilir: • Örnek DNA'sının reaksiyon kuyucuğuna eklenmesinde pipetleme hatası. • Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. • İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir. • Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır. • Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar primerlerle ve/veya yabanıl tip proba kapatılmıştır.

REFERANSLAR

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

Belge revizyonu bilgileri	
Doc Rev. 10.0 08/2019	KULLANIM AMACI ve TEST ÖZETİ VE AÇIKLAMASI bölümleri güncellenmiştir. ZELBORAF®'ın (vemurafenib) Klinik Etkililiği ve COTELLIC®'in (kobimetinib) Klinik Etkililiği bölümleri eklenmiştir. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, TAŞINMASI VE SAKLANMASI bölümüne slayt stabilite bilgileri eklenmiştir. PROSEDÜR İLE İLGİLİ SINIRLAMALAR bölümüne melanin ile ilgili ifade eklenmiştir. Açıklama sağlamak ve cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test US-IVD IFU ile uyum için genel anlatım güncellemeleri eklenmiştir. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche Temsilciniz ile iletişime geçin.
11/2019	PDF'in doğru işlenmesi için 24. sayfada “büyüktür ya da eşittir” sembolünün yazı tipi düzeltilmiş ve “FFFPET” ifadesi “FFPET” olarak düzeltilmiştir. Uyumlaştırılmış sembol sayfası güncellenmiştir. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche Temsilciniz ile iletişime geçin.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Aşağıdaki DNA Sample Preparation kit bilgileri kaldırılmıştır: • Reaktif listeleri ve bileşim bilgileri • İlgili prosedür adımları ve notlar Başlangıçta ve Prosedür ile ilgili Sınırlamalar bölümünde cobas® DNA Sample Preparation Kit Kullanım Talimatlarına referans eklenmiştir. Sistem ve Kullanıcı Kılavuzları, belge genelinde “cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Kılavuzu veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı” olarak güncellenmiştir. Yazım hataları düzeltilmiş ve ABD Kullanma Talimatları ile uyumluluk ve belge genelinde anlatım tutarlılığı ve standardizasyonu için güncellenmiştir. Sonuç uyarı işaretleri eklenmiştir. Uluslararası Hava Taşımacılığı Birliği referansı güncellenmiştir. Uyumluluk sembol sayfası, ticari markalar ve patentler bölümü ve distribütör adresleri güncellenmiştir. Ürün güvenliliği etiketlemesinde temel olarak AB GHS kılavuzlarının takip edildiğini açıklayan ifade eklenmiştir. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche Temsilciniz ile iletişime geçin.

Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilmiştir



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

Ticari markalar ve patentler

COBAS, COBAS Z ve AMPERASE, Roche şirketinin ticari markalarıdır.

Tüm diğer ürün adları ve ticari markalar, ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

AmpErase enzimidaki bulaşma önleyici teknoloji, Life Technologies tarafından sahip olunan ve Roche Molecular Systems, Inc.'nin lisansına sahip olduğu ABD Patenti 7,687,247 kapsamı altındadır.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-01



Aşağıdaki semboller Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılır.



Yardımcı yazılım



Seri kodu



Avrupa Topluluğundaki yetkili temsilci



Biyolojik riskler



Barkod Veri Sayfası



Katalog numarası



Kullanım talimatlarına bakın



Sadece IVD performans değerlendirmesi için



<n> test için yeterli miktarda içerir



Belirlenen aralığın alt limiti



Kit içeriği



Üretici



Dağıtımçı



Karanlık ortamda muhafaza edin



In vitro Tıbbi Tanı cihazı



Sıcaklık sınırı



Test tanım dosyası



Son kullanma tarihi



Belirlenen aralığın üst limiti

Rx Only

Yalnızca ABD: Federal yasalar, bu cihazın yalnızca bir hekim tarafından veya hekimin siparişiyle satışına izin verir.



Küresel ticaret ürün numarası



Üretim tarihi



CE uygunluk işareti; bu cihaz, *in vitro* tıbbi tanı cihazı için geçerli CE işareti gerekliliklerine uygundur

ABD için Müşteri Teknik Destek Hattı 1-800-526-1247