

Тест на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

cobas®

для ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Информацию о пробоподготовке см. в наборе для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

НАЗНАЧЕНИЕ

Основным назначением теста на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test является обнаружение мутаций V600 гена BRAF в ДНК, выделенной из ткани меланомы и папиллярной карциномы щитовидной железы (ПКЩЖ) человека, фиксированной формалином и залитой в парафин. При меланоме этот тест помогает выявить пациентов, у которых опухоль имеет мутацию V600 в гене BRAF, для терапии только препаратом ZELBORAF® (вемурафениб) или комбинацией препаратов COTELLIC® (кобиметиниб) в сочетании с препаратом ZELBORAF® (вемурафениб).

ОПИСАНИЕ ТЕСТА

Активирующие мутации протоонкогена BRAF встречаются при многих злокачественных новообразованиях у человека, включая злокачественную меланому, колоректальный рак, рак яичников и рак щитовидной железы^{1,2}. Мутации гена BRAF выявляют в 40–60 % злокачественных меланом³ и в 36–46 % папиллярных карцином щитовидной железы^{4,5}. Мутации гена BRAF также распространены в доброкачественных невусах⁶, что свидетельствует о возникновении мутаций на ранних этапах онкогенеза. Обнаружение таких соматических мутаций в гене BRAF при меланоме, ПКЩТ и других опухолях у человека помогло выяснить центральную роль BRAF-киназы в сигнальных путях, контролирующей клеточную пролиферацию, дифференциацию и гибель клеток. В нормальных клетках BRAF является частью строго регулируемого сигнального пути, который передает сигнал от рецепторов факторов роста (таких как EGFR) через RAS, RAF, MEK и ERK. Онкогенные мутации в гене BRAF приводят к активации функции киназы, что делает путь RAF-MEK-ERK постоянно активным при отсутствии типичных факторов роста.

Большинство мутаций гена BRAF при меланоме, ПКЩТ и других опухолях человека возникают в кодоне 600⁷. Преобладающая мутация в кодоне 600 — это мутация V600E (замена ГТГ на ГАГ). Реже встречаются некоторые динуклеотидные мутации, затрагивающие кодон 600 [V600K (ГТГ > ААГ), V600R (ГТГ > АГГ), V600E2 (ГТГ > ГАА) и V600D (ГТГ > ГАТ)], в основном при меланоме и реже при других опухолях, таких как колоректальный рак.

Тест на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test — это тест методом ПЦР в режиме реального времени, разработанный для обнаружения мутации V600E (T1799A). Тест на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test используется в качестве сопутствующего диагностического теста для лечения вемурафенибом, химическим соединением, которое ингибирует ген BRAF с мутацией V600E. Клинические исследования на пациентах с развитой стадией меланомы показали, что те, у кого опухоль имеет мутацию V600E, с большей вероятностью могут получить клиническую пользу от этого соединения^{8,9}. В дальнейшем клиническое исследование комбинации кобиметиниба и вемурафениба у пациентов с развитой стадией меланомы показало, что пациенты с опухолью, имеющей мутацию V600E или V600K, обнаруженную с помощью теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test, с большей вероятностью получают клиническую пользу от лечения^{10,11}. Мутация V600K присутствует примерно в 10–15 % образцов меланом с мутациями V600 гена BRAF¹².

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Тест на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (тест cobas BRAF) основан на двух процессах: (1) ручной пробоподготовке для выделения геномной ДНК из ткани, фиксированной формалином и залитой в парафин (FFPET); (2) ПЦР-амплификации и детекции ДНК-мишени с помощью пар комплиментарных праймеров и двух олигонуклеотидных зондов, меченных различными флуоресцентными красителями. Один зонд предназначен для детекции дикого типа последовательности V600 гена BRAF, другой — для детекции мутантной последовательности V600E. В набор входят два внешних контроля постановки, а аллель дикого типа служит в качестве внутреннего контроля полного процесса.

Пробоподготовка

Подготовка образцов FFPET и выделение геномной ДНК проводится с использованием набора для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit и представляет собой стандартную ручную пробоподготовку, основанную на связывании нуклеиновой кислоты со стекловолокном. Депарафинизированный срез образца FFPET толщиной 5 мкм лизируют путем инкубации при повышенной температуре с протеазой и хаотропным буфером для лизиса/связывания, который высвобождает нуклеиновые кислоты и защищает высвободившуюся геномную ДНК от ДНКаз. Затем к лизируемой смеси добавляют изопропанол, после чего центрифугируют через колонку со стекловолоконным фильтром-вкладышем. Во время центрифугирования геномная ДНК связывается с поверхностью стекловолоконного фильтра. Несвязавшиеся вещества, например соли, белки и другие клеточные примеси, удаляются путем центрифугирования. Связавшиеся нуклеиновые кислоты вымываются и затем элюируются водным раствором. Количество

геномной ДНК определяется спектрофотометрически и доводится до фиксированной концентрации для добавления к смеси для амплификации/детекции. ДНК-мишень затем амплифицируется и обнаруживается на анализаторе **cobas z 480** с помощью реагентов для амплификации и детекции, входящих в тест **cobas BRAF**.

ПЦР-амплификация и детекция

Выбор мишени

В тесте **cobas BRAF** используются праймеры, которые определяют последовательность из 116 пар нуклеотидов геномной ДНК человека, содержащую сайт кодона BRAF 600 в экзоне 15. Весь ген BRAF не амплифицируется. Тест **cobas BRAF** разработан для детекции замены Т > А в нуклеотиде 1799 гена BRAF, которая приводит к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E). Мишень-специфичные зонды TaqMan к исходной немутантной и мутантной последовательности ДНК BRAF, меченные флуоресцентным красителем, связываются с последовательностями дикого типа и мутантными, соответственно. Последовательности дикого типа и мутантные детектируются путем использования выделенного оптического канала для каждой последовательности.

Амплификация мишени

Для амплификации мишени используется ДНК-полимераза Z05 вида *Thermus*. Сначала реакционная смесь для ПЦР нагревается для денатурации геномной ДНК, чтобы открылись сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси прямой и обратный праймеры гибридизуются с последовательностями ДНК-мишени. Z05 ДНК-полимераза в присутствии иона двухвалентного металла и избытка dNTP удлинит каждый связавшийся праймер, синтезируя таким образом вторую цепочку ДНК. Этим завершается первый цикл ПЦР, в котором образуется двухцепочная копия ДНК участка-мишени гена BRAF длиной 116 пар нуклеотидов. Этот процесс повторяется многократно, и в каждом цикле количество ампликонов ДНК удваивается. Амплификация происходит только в участке гена BRAF между праймерами.

Автоматическая детекция в реальном времени

В тесте **cobas BRAF** используется технология ПЦР в режиме реального времени. Каждый мишень-специфичный олигонуклеотидный зонд в реакции помечен флуоресцентным красителем, служащим репортером, и молекулой гасителя, которая поглощает (гасит) флуоресцентное излучение репортерного красителя внутри интактного зонда. Во время каждого цикла амплификации зонд, комплементарный последовательности одноцепочечной ДНК в ампликоне, связывается и затем расщепляется за счет 5'-3' нуклеазной активности Z05 ДНК-полимеразы. Как только репортерный краситель отделяется от гасителя вследствие нуклеазной активности, появляется измеримая флуоресценция с характерной длиной волны при возбуждении репортерного красителя соответствующим спектром света. Чтобы пометить мишень-специфичные зонды BRAF для дикого типа (ДТ) и V600E-мутантного типа, на который нацелен тест, используют два различных репортерных красителя. Амплификацию двух последовательностей гена BRAF можно обнаружить независимо в одной реакционной лунке путем измерения флуоресценции с двумя характерными длинами волн в определенных оптических каналах.

Избирательная амплификация

Избирательная амплификация нуклеиновой кислоты-мишени из образца в тесте **cobas BRAF** осуществляется за счет фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP)¹³. Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей тимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку dUTP в качестве одного из нуклеотидных трифосфатов входит в состав реагентов реакционной смеси. Поэтому дезоксиуридин содержится только в ампликонах. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента реакционной смеси, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции С1. При нагревании на первом этапе термоциклирования в щелочной среде ДНК-цепь ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, ДНК больше не подлежит амплификации. Фермент AmpErase неактивен при температуре выше 55 °С, т. е. на этапах термоциклирования, и, следовательно, не разрушает нужный ампликон.

РЕАГЕНТЫ

Тест на мутации cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 теста (M/N: 05985595190)			
Компоненты набора	Состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения ^a
RXNMIX (реакционная смесь)	Трициновый буфер Ацетат калия Гидроксид калия Глицерин Tween 20 ЭДТА 5 % диметилсульфоксид < 0,09 % dNTP < 0,10 % Z05 ДНК-полимераза (бактериальная) < 0,10 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,003 % олигонуклеотидный аптамер 0,08 % азид натрия	3 × 0,16 мл	Н/П
MGAC (ацетат магния)	Ацетат магния 0,09 % азид натрия	3 × 0,15 мл	Н/П
BRAF OM (BRAF Oligo Mix)	Трис-НСI буфер ЭДТА 0,09 % азид натрия Поли-гА РНК (синтезированная) < 0,01 % прямой и обратный праймер для гена BRAF < 0,01 % зонды для гена BRAF, меченные флуоресцентным красителем	3 × 0,13 мл	Н/П
BRAF MUT (контроль мутантного BRAF)	Трис-НСI буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтезированная) 0,05 % азид натрия < 0,001 % плазмидной ДНК (бактериальной), содержащей мутантную последовательность гена BRAF < 0,001 % плазмидной ДНК (бактериальной), содержащей дикий тип последовательности гена BRAF	2 × 0,13 мл	Н/П
BRAF WT (контроль дикого типа гена BRAF)	Трис-НСI буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтезированная) 0,05 % азид натрия < 0,001 % плазмидной ДНК (бактериальной), содержащей дикий тип последовательности гена BRAF	2 × 0,13 мл	Н/П
DNA SD (дилуэнт для образцов ДНК)	Трис-НСI буфер 0,09 % азид натрия	2 × 1 мл	Н/П

^a Маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

А. ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

- Б. Данный тест предназначен для использования с образцами ткани, фиксированной формалином и залитой в парафин.
- В. Не пипетируйте ртом.
- Г. Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих лабораторных помещениях.
- Д. Не допускайте микробную и ДНК-контаминацию реагентов.
- Е. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с государственными, федеральными и региональными правилами.
- Ж. Не используйте набор по истечении срока годности.
- З. Не объединяйте реагенты из разных наборов или лотов.
- И. Паспорта безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве компании Roche.
- К. Для предотвращения контаминации необходимо работать в одноразовых перчатках и менять их при переходе от работы с образцами к работе с реагентами **cobas**[®] 4800.
- Л. Чтобы избежать контаминации рабочего мастермикса образцами ДНК, амплификацию и детекцию следует выполнять в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Перед приготовлением мастермикса необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для качественной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, следует тщательно протереть салфеткой, смоченной в 0,5%-ном растворе гипохлорита натрия *, а затем — 70%-м этанолом.
*** ПРИМЕЧАНИЕ. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.**
- М. Образцы нужно рассматривать как инфекционные и соблюдать при работе с ними правила лабораторной безопасности, приведенные в документах *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ и CLSI Document M29 A4¹⁵.
- Н. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT** и **DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может вступать в реакцию со свинцом и медью, которые содержатся в трубах канализации, что приводит к образованию взрывоопасных азидов. При сливе отходов, содержащих азид натрия, в лабораторную раковину смывайте их большим количеством холодной воды, чтобы предотвратить накопление азидов.
- О. Работайте с любыми реагентами в средствах для защиты глаз, лабораторном халате и одноразовых перчатках. Избегайте попадания данных материалов в глаза, на кожу или слизистые оболочки. При попадании немедленно промойте большим количеством воды. В противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой, затем вытрите насухо.
- П. Все одноразовые материалы используются только один раз. Не используйте их повторно.
- Р. Не используйте одноразовые материалы с истекшим сроком годности.
- С. Не используйте раствор гипохлорита натрия (хлорку) для очистки анализатора **cobas z 480**. Проводите очистку анализатора **cobas z 480** согласно процедурам, описанным в руководстве пользователя системы **cobas**[®] 4800 или в поддержке пользователя системы **cobas**[®] 4800.
- Т. За дополнительными сведениями о мерах предосторожности и процедурах по снижению риска контаминации при работе с анализатором **cobas z 480** обратитесь к руководству пользователя системы **cobas**[®] 4800 или к поддержке пользователя системы **cobas**[®] 4800.
- У. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от ДНКаз наконечники.

ХРАНЕНИЕ И ПРАВИЛА РАБОТЫ

- А. Реагенты не замораживать.
- Б. Храните реагенты **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT** и **DNA SD** при 2–8 °С. После вскрытия эти реагенты стабильны для 4 использований в течение 60 дней или до истечения срока годности, если он наступит раньше.
- В. Реагент **BRAF OM** и рабочий мастермикс Master Mix (приготовленный путем добавления **BRAF OM** и **MGAC** к **RXNMIX**) следует оберегать от длительного воздействия света.
- Г. Храните рабочий мастермикс Master Mix (приготовленный путем добавления **BRAF OM** и **MGAC** к **RXNMIX**) при 2–8 °С в темном месте. Подготовленные образцы и контроли следует добавить в течение 1 часа после приготовления рабочего мастермикса Master Mix.

- Д. Обработанные образцы (выделенная ДНК) стабильны до 24 часов при 15–30 °С, до 14 дней при 2–8 °С, до 60 дней при –15...–25 °С и после 3 оттаиваний, если хранились при –15...–25 °С. Выделенную ДНК следует амплифицировать в течение рекомендованных промежутков хранения или до истечения срока годности набора для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit, использованного для выделения ДНК, если он наступит раньше.
- Е. Амплификацию следует начинать в течение 1 часа после того, как обработанные образцы и контроли были добавлены к рабочему мастермиксу Master Mix (приготовленному путем добавления **BRAF OM** и **MGAC** к **RXNMIX**).

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

BRAF

24 теста

RXNMIX

(реакционная смесь) (крышка с бежевой кнопкой)

MGAC

(ацетат магния) (крышка с желтой кнопкой)

BRAF OM

(BRAF Oligo Mix) (черная крышка с белой кнопкой)

BRAF MUT

(BRAF мутантный контроль) (крышка с красной кнопкой)

BRAF MUT

(BRAF дикий контроль) (крышка с синей кнопкой)

DNA SD

(дилуэнт для образцов ДНК) (крышка с фиолетовой кнопкой)

НЕОБХОДИМЫЕ НЕПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Набор для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190).
- Микропланшет (AD-планшет) и заклеивающая пленка для системы **cobas**[®] 4800 (Roche M/N 05232724001).
- Дозаторы переменного объема * (объемом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл) с наконечниками с аэрозольным барьером или прямого вытеснения, свободными от ДНКаз.
- Микроцентрифужные пробирки с защелкивающейся крышкой (1,5 мл, стерильные, свободные от РНКаз/ДНКаз, степень чистоты — для ПЦР) (любой поставщик).
- Спектрофотометр для измерения концентрации ДНК **.
- Вортекс **.
- Штативы для микроцентрифужных пробирок.
- Одноразовые перчатки, без талька.
- Морозильная камера для хранения при –25...–15 °С.

* Дозаторы следует обслуживать согласно рекомендациям производителя и поддерживать их точность, чтобы погрешность не превышала 3 % от заявленного объема. Наконечники с аэрозольным барьером или прямым вытеснением, свободные от ДНКаз, следует использовать там, где рекомендуется защита образца от разрушения и перекрестной контаминации.

** Все оборудование должно эксплуатироваться в соответствии с инструкциями производителя.

Оборудование и программное обеспечение

- Анализатор **cobas z 480**
- Управляющий компьютер системы **cobas**[®] 4800 SR2 System Control Unit с образом OSXP
- Программа **cobas**[®] 4800 SR2 System 2.0 или более поздней версии
- Аналитический пакет BRAF Analysis Package Software версии 1.0 или более поздней
- Сканер штрихкода (Roche M/N 05339910001)
- Принтер HP P2055d (Roche M/N 05704375001)

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ПРИМЕЧАНИЕ. *Работайте со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами.*

А. Сбор образцов

Образцы FFPEТ валидированы для использования с тестом **cobas BRAF**.

Б. Транспортировка образцов

Образцы FFPEТ могут транспортироваться при 15–30 °С. Транспортировку образцов FFPEТ необходимо производить в соответствии с федеральными, государственными и прочими правилами транспортировки этиологических агентов ¹⁶.

В. Хранение образцов

Подтверждена стабильность образцов FFPEТ, хранившихся при 15–30 °С до 12 месяцев после сбора. Срезы FFPEТ толщиной 5 мкм, нанесенные на предметные стекла, могут храниться при 15–30 °С до 60 дней.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ПРИМЕЧАНИЕ. *Перед использованием все реагенты, кроме **RXNMIX**, **MGAC** и **BRAF OM**, должны быть комнатной температуры. Реагенты **RXN MIX**, **MGAC** и **BRAF OM** можно извлекать из места хранения при 2–8 °С непосредственно перед началом подготовки рабочего мастермикса **Master Mix**.*

ПРИМЕЧАНИЕ. *Только срезы **FFPEТ** меланомы и **ПКЩЖ** толщиной 5 мкм, содержащие не менее 50 % опухолевых клеток, пригодны для использования в тесте **cobas® BRAF**. Если в образце менее 50 % опухолевых клеток, образец нужно подвергнуть макродиссекции после депарафинизации.*

ПРИМЕЧАНИЕ. *Подробные рекомендации по работе с анализатором **cobas z 480**, описаны в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или в поддержке пользователя системы **cobas® 4800**.*

Объем постановки

Тест **cobas BRAF** разработан для постановки теста на 3 и до максимум 24 образцах плюс контроля. С помощью набора можно делать постановку менее 3 образцов плюс контроля, но это может привести к недостаточному объему реагентов для постановки всего теста на 24 образцах плюс контроля. Тест **cobas BRAF** содержит реагенты в объеме, достаточном для 8 постановок теста по 3 образца плюс контроля. Один повтор мутантного контроля теста **cobas BRAF Test Mutant Control [BRAF MUT]** и один повтор контроля дикого типа **cobas BRAF Test Wild-Type Control [BRAF WT]** необходимы для каждой постановки (см. раздел «Контроль качества»).

Рабочий процесс

ПРИМЕЧАНИЕ. *Тест **cobas BRAF** может использоваться для постановки одновременно до 24 образцов.*

ПРИМЕЧАНИЕ. *Чтобы максимально использовать реагенты, постановка теста должна включать как минимум три (3) образца от пациентов плюс контроля.*

Выделение ДНК

ДНК выделяется из образцов FFPEТ с помощью набора для пробоподготовки **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190).

Макродиссекция

Если в образце менее 50 % опухолевого содержимого по площади, образец нужно подвергнуть макродиссекции в рамках пробоподготовки.

Количественное определение ДНК

ПРИМЕЧАНИЕ. *Измерение концентрации ДНК должно выполняться немедленно после процедуры выделения ДНК и перед хранением.*

- А. Перемешайте на вортексе каждый образец исходной ДНК в течение 5 секунд.
- Б. Определите концентрацию ДНК спектрофотометром согласно протоколу производителя. Используйте **DNA EB** из набора для пробоподготовки **cobas® DNA Sample Preparation Kit** в качестве холостой пробы для прибора. Необходимо среднее от 2 согласующихся показаний. Если измеренные концентрации ДНК составляют $\geq 20,0$ нг/мкл, два измерения должны отличаться друг от друга не более чем на $\pm 10\%$. Если измеренные концентрации ДНК составляют $< 20,0$ нг/мкл, разница между двумя измерениями не должна превышать $\pm 2,0$ нг/мкл.
- В. Для выполнения теста **cobas BRAF** концентрация образца исходной ДНК должна быть ≥ 5 нг/мкл.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для выполнения теста *cobas BRAF* каждый исходный образец ДНК должен иметь концентрацию не менее 5 нг/мкл. Если концентрация исходной ДНК < 5 нг/мкл, повторите депарафинизацию, выделение ДНК и количественное определение ДНК для этого образца, используя 2 среза FFPEТ толщиной 5 мкм. Для подготовки образцов, фиксированных на стеклах, после депарафинизации объедините два среза ткани в одной пробирке, погрузите ткань в TLВ плюс РК из набора для пробоподготовки *cobas® DNA Sample Preparation Kit*, выполните выделение ДНК и подсчет ее количества. Для подготовки образцов, не фиксированных на предметных стеклах, объедините два среза ткани в одной пробирке и выполните депарафинизацию, выделение ДНК и подсчет ее количества. Если концентрация исходной ДНК все еще составляет < 5 нг/мкл, запросите другой образец FFPEТ из соответствующей лаборатории.

ПРИМЕЧАНИЕ. Обработанные образцы (выделенная ДНК) стабильны до 24 часов при 15–30 °С, до 14 дней при 2–8 °С, до 60 дней при –15...–25 °С и после 3 оттаиваний, если хранились при –15...–25 °С. Выделенную ДНК следует амплифицировать в течение рекомендованных промежутков хранения или до истечения срока годности набора для пробоподготовки *cobas® DNA Sample Preparation Kit*, использованного для выделения ДНК, если он наступит раньше.

АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ

ПРИМЕЧАНИЕ. Чтобы избежать контаминации рабочего мастермикса образцами ДНК, амплификацию и детекцию следует выполнять в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Перед приготовлением мастермикса необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для качественной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, следует тщательно протереть салфеткой, смоченной в 0,5%-ном растворе гипохлорита натрия, а затем — 70%-м этанолом. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.

Подготовка прибора

Подробную информацию о подготовке анализатора *cobas z 480 см.* в руководстве пользователя системы *cobas® 4800* или в поддержке пользователя системы *cobas® 4800*.

Создание назначения теста

Подробную информацию об этапах рабочего процесса тестирования *cobas BRAF см.* в руководстве пользователя системы *cobas® 4800* или в поддержке пользователя *cobas® 4800*.

Расчет разведения исходного образца ДНК

Для каждого образца проводится только один цикл амплификации/детекции, что требует 25 мкл общего объема исходной ДНК в разведении 5 нг/мкл (всего 125 нг). Приведенные ниже инструкции описывают, как подготовить минимум 35 мкл исходной ДНК в разведении 5 нг/мкл в зависимости от исходной концентрации ДНК. Это гарантирует, что для каждого образца используется минимум 5 мкл исходной ДНК, чтобы предотвратить отклонения, возможные при раскапывании меньших объемов образца.

Расчет разведения при концентрации исходной ДНК от 5 нг/мкл до 35 нг/мкл

ПРИМЕЧАНИЕ. Исходную ДНК из образцов следует разводить непосредственно перед амплификацией и детекцией.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для каждого образца проводится только один цикл амплификации/детекции, что требует 25 мкл общего объема исходной ДНК в разведении 5 нг/мкл (всего 125 нг).

А. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем исходной ДНК с помощью следующей формулы:

Необходимый бъем исходной ДНК [мкл] = (35 мкл × 5 нг/мкл) ÷ концентрация исходной ДНК в нг/мкл

Б. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем дилуента для образцов ДНК (**DNA SD**) с помощью следующей формулы:

Необходимый объем DNA SD [мкл] = (35 мкл – объем исходной ДНК в мкл)

Пример

Концентрация исходной ДНК = 21 нг/мкл

А. Необходимый объем исходной ДНК = (35 мкл × 5 нг/мкл) ÷ 21 нг/мкл = 8,3 мкл

Б. Необходимый объем DNA SD [мкл] = (35 мкл – 8,3 мкл) = 26,7 мкл

Расчет разведения при концентрации ДНК исходного образца > 35 нг/мкл

ПРИМЕЧАНИЕ. Исходную ДНК из образцов следует разводить непосредственно перед амплификацией и детекцией.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для каждого образца проводится только один цикл амплификации/детекции, что требует 25 мкл общего объема исходной ДНК в разведении 5 нг/мкл (всего 125 нг).

- А. При концентрации исходной ДНК > 35 нг/мкл используйте следующую формулу для расчета количества дилуента для образцов ДНК (**DNA SD**), необходимого для приготовления не менее 35 мкл разведенной исходной ДНК. Это необходимо для того, чтобы в каждом образце использовалось не менее 5 мкл исходной ДНК.

Необходимый объем DNA SD [мкл] = [(5 мкл исходной ДНК × концентрация исходной ДНК в нг/мкл) ÷ 5 нг/мкл] – 5 мкл

- Б. Используйте рассчитанный объем **DNA SD**, чтобы развести 5 мкл исходной ДНК.

Пример

Концентрация исходной ДНК = 42 нг/мкл

А. Необходимый объем DNA SD [мкл] = [(5 мкл × 42 нг/мкл) ÷ 5 нг/мкл] – 5 мкл = 37 мкл

Б. Используйте рассчитанный объем **DNA SD**, чтобы развести 5 мкл исходной ДНК.

Разведение образца

- А. Подготовьте необходимое количество микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 мл для разведений ДНК, указав на них соответствующий идентификатор образца, в зоне добавления образца.
- Б. С помощью дозатора с наконечником с аэрозольным барьером пипетируйте рассчитанные объемы дилуента для образцов ДНК (**DNA SD**) в каждую промаркированную пробирку.
- В. Перемешайте на вортексе каждый исходный образец ДНК в течение 10 секунд.
- Г. С помощью дозатора с наконечником с аэрозольным барьером аккуратно пипетируйте рассчитанный объем исходной ДНК в соответствующую пробирку, содержащую **DNA SD**. Для каждого образца используйте новый наконечник.
- Д. Закройте пробирки крышками и перемешайте на вортексе каждый разведенный исходный образец ДНК в течение 10 секунд.
- Е. Смените перчатки.

Подготовка рабочих мастермиксов Master Mix (MMX)

ПРИМЕЧАНИЕ. Реагент **BRAF Oligo Mix** и рабочий **MMX** являются фоточувствительными. Все открытые смеси с реагентом **BRAF OM** и рабочим **MMX** следует оберегать от продолжительного воздействия света.

- А. Рассчитайте необходимый объем **RXNMIX** с помощью следующей формулы:
Необходимый объем **RXNMIX** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 10 мкл
- Б. Рассчитайте необходимый объем **BRAF OM** с помощью следующей формулы:
Необходимый объем **BRAF OM** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 8 мкл
- В. Рассчитайте необходимый объем **MGAC** с помощью следующей формулы:
Необходимый объем **MGAC** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 7 мкл

Табл. 1 может использоваться для определения объемов каждого реагента, необходимых для подготовки рабочего MMX, основываясь на количестве образцов, включенных в постановку.

Табл. 1

		Объемы реагентов, необходимые для рабочего мастермикса									
		Количество образцов*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 мкл	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 мкл	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 мкл	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Общий объем, мкл		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Количество образцов + 2 контроля + 1

- Г. Извлеките соответствующее количество пробирок с **RXNMIX**, **BRAF OM** и **MGAC** из места хранения при 2–8 °С. Перед использованием перемешайте на вортексе каждый реагент в течение 5 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирки. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки для рабочего мастермикса (MMX).
- Д. Внесите рассчитанный объем **RXNMIX** в промаркированную пробирку для MMX.

- Е. Внесите рассчитанный объем **BRAF OM** в промаркированную пробирку для ММХ.
 Ж. Внесите рассчитанный объем **MGAC** в промаркированную пробирку для ММХ.
 З. Перемешайте пробирки на вихре в течение 5 секунд, чтобы гарантировать тщательное перемешивание.

ПРИМЕЧАНИЕ. Используйте только микропланшет (AD-планшет) и заклеивающую пленку для системы cobas® 4800 (Roche M/N 05232724001).

- И. Аккуратно внесите 25 мкл рабочего ММХ в каждую реакционную лунку AD-планшета, необходимую для постановки. Не касайтесь наконечником дозатора планшета за пределами лунки.

Внесение контролей и образцов

- А. Внесите 25 мкл контроля **BRAF MUT** в лунку **A01** AD-планшета. перемешайте пипетированием не менее двух раз.
 Б. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл контроля **BRAF WT** в лунку **B01** AD-планшета. перемешайте пипетированием не менее двух раз.

ПРИМЕЧАНИЕ. Каждая постановка должна содержать контроль BRAF MUT в позиции A01 и контроль BRAF WT в позиции B01, в противном случае постановка будет считаться анализатором cobas z 480 невалидной.

ПРИМЕЧАНИЕ. Меняйте перчатки по необходимости, чтобы предотвратить контаминацию от образца к образцу и внешнюю контаминацию реакционной пробирки для ПЦР.

- В. С помощью дозатора с наконечником с аэрозольным барьером внесите 25 мкл разведенного раствора ДНК в соответствующую лунку, содержащую рабочий ММХ, начиная с позиции **C01** на AD-планшете, следуя схеме на Рис. 1 ниже. Перемешайте дозатором, аспирировав реакционную смесь из лунки и выпустив ее обратно не менее двух раз. Убедитесь в том, что жидкость собралась на дне лунки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Образцы ДНК и контроли следует добавлять в AD-планшет в течение 1 часа после подготовки рабочего мастермикса Master Mix (ММХ).

Рис. 1

Схема планшета с образцами

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

- Г. Продолжайте, пока все образцы для тестирования не будут внесены в AD-планшет.
 Д. Накройте AD-планшет заклеивающей пленкой (поставляется вместе с планшетами). Используйте аппликатор для заклеивающей пленки, чтобы плотно наклеить ее на AD-планшет.
 Е. Перед началом амплификации и детекции убедитесь, что все жидкости собрались на дне каждой лунки.

ПРИМЕЧАНИЕ. Амплификацию и детекцию следует начинать в течение 1 часа после добавления образца ДНК и контролей к рабочему ММХ.

Начало ПЦР

Подробную информацию об этапах рабочего процесса тестирования BRAF см. в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или в поддержке пользователя **cobas® 4800**.

Интерпретация результатов

ПРИМЕЧАНИЕ. Валидность всех постановок и образцов определяется программой **cobas® 4800 BRAF AP**.

ПРИМЕЧАНИЕ. Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты отдельных образцов.

В Табл. 2 приведена интерпретация результатов анализа образцов в случае валидной постановки.

Табл. 2
Интерпретация результатов

Результат теста cobas BRAF	Интерпретация
Mutation Detected	Мутация V600 выявлена в кодоне 600 экзона 15 гена BRAF
Mutation Not Detected или No Mutation Detected*	Мутация V600 не выявлена в кодоне 600 экзона 15 гена BRAF
Invalid	Результат невалиден. Повторите тестирование образцов с невалидными результатами, следуя инструкциям, указанным в разделе « Повторное тестирование образцов с невалидными результатами » ниже.
Failed	Неудачная постановка из-за аппаратного или программного сбоя

* Результат «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена) или «No Mutation Detected» (Ни одна мутация не обнаружена) не исключает наличия мутации на участке в кодоне 600 гена BRAF, потому что результаты зависят от числа копий мутантной последовательности в образце и на них может повлиять целостность образца, количество выделенной ДНК и присутствие интерферирующих веществ.

Повторное тестирование образцов с невалидными результатами

А. Повторите разведение исходной ДНК невалидных образцов, начиная с процедур «**Расчет разведения исходного образца ДНК**» и «**Разведение образцов**» в разделе «**АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ**».

Примечание. Если оставшегося количества образца исходной ДНК недостаточно для проведения нового разведения, получите новый срез ткани толщиной 5 мкм и повторно выделите ДНК с помощью набора для пробоподготовки **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)**, затем перейдите к этапу Б, описанному ниже.

Б. После разведения исходной ДНК до 5 нг/мкл, как описано в процедуре «**Разведение образцов**», выполните дополнительное разведение 1:2, взяв 20 мкл разведенной исходной ДНК и добавив 20 мкл дилуента для образцов ДНК (**DNA SD**).

В. Затем выполните процедуру «**Подготовка рабочего мастермикса Master Mix (MMX)**» и остальные этапы процедуры амплификации и детекции.

Примечание. Если образец остается невалидным после повторного тестирования в разведении 1:2, повторите всю процедуру тестирования для этого образца, начиная с выделения ДНК с помощью набора для пробоподготовки **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** с использованием нового среза **FFPET** толщиной 5 мкм. Для амплификации и детекции следует использовать стандартный образец ДНК в концентрации 5 нг/мкл объемом 25 мкл (без дальнейшего разведения).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Мутантный контроль теста **cobas BRAF Mutant (BRAf MUT)** и контроль дикого типа (**BRAf WT**) включаются в каждую постановку. Постановка валидна, если лунка с контролем **BRAf MUT (A01)** и лунка с контролем **BRAf WT (B01)** имеют валидный статус. Если один из контролей **BRAf MUT** или **BRAf WT** невалиден, постановку следует повторить. Чтобы настроить новый AD-планшет с контролями для амплификации и детекции, подготовьте свежее разведение ранее выделенного образца исходной ДНК.

Мутантный контроль BRAf Mutant Control

Результат контроля **BRAf MUT** должен быть «валидный». Если результаты контроля **BRAf MUT** последовательно невалидны, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

Контроль дикого типа BRAf Wild-Type Control

Результат контроля **BRAf WT** должен быть «валидный». Если результаты контроля **BRAf WT** последовательно невалидны, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ПРОЦЕДУР

Как и при выполнении любых тестов, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием надлежащих рабочих характеристик данного теста. Вследствие высокой аналитической чувствительности тестов, основанных на ПЦР, необходимо тщательно оберегать от контаминации реагенты и амплификационные смеси.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУР

1. Тестируйте только указанные типы образцов. Тест **cobas** BRAF валидирован только для образцов FFPEТ меланомы и ПКЩЖ.
2. Тест **cobas** BRAF валидирован только с набором для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190) для выделения геномной ДНК.
3. Обнаружение мутации зависит от числа копий мутантной последовательности в образце, и на нее может повлиять целостность образца, количество выделенной ДНК и присутствие интерферирующих веществ.
4. Надежность результатов теста зависит от соблюдения правил фиксации, транспортировки, хранения и обработки образцов. Следуйте процедурам, описанным в этом вкладыше в упаковке, в руководстве пользователя системы **cobas**[®] 4800 или в поддержке пользователя системы **cobas**[®] 4800.
5. Внесение фермента AmpErase в реакционную смесь **cobas** BRAF Test Reaction Mix обеспечивает избирательность амплификации ДНК-мишени; тем не менее, надлежащая лабораторная практика и тщательное соблюдение процедур, описанных в данном вкладыше в упаковке, являются необходимыми условиями предотвращения контаминации реагентов.
6. К работе с данным продуктом допускается только персонал, обученный проведению ПЦР и работе с системой **cobas**[®] 4800.
7. Только система **cobas**[®] 4800 валидирована для использования с этим продуктом. Никакая другая система для ПЦР не была валидирована для этого продукта.
8. Вследствие естественных различий между технологиями пользователю рекомендуется, прежде чем заменить одну технологию на другую, провести корреляционные испытания для двух методов, чтобы оценить возможные различия между технологиями.
9. Эффекты других возможных переменных, например переменных фиксации образца, не оценивались.
10. В редких случаях мутации и варианты в участках гена BRAF, перекрываемых праймерами или зондами, используемыми в тесте **cobas** BRAF, могут помешать амплификации аллеля V600 гена BRAF или детекции мутации в кодоне 600.
11. Присутствие ингибиторов ПЦР может привести к ложноотрицательным или невалидным результатам.
12. Меланин является известным ингибитором реакций ПЦР. Набор для пробоподготовки ДНК удаляет меланин из образца во время выделения, тем не менее, остаточный меланин в образце все еще может привести к невалидным результатам. Если предполагается меланиновое ингибирование, рекомендуется повторить тестирование после разведения 1:2, как описано в процедуре «Повторное тестирование образцов с невалидными результатами».
13. Тест на мутации **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test обладает ограниченной перекрестной реактивностью с образцами, содержащими иные мутации, не относящиеся к V600E (V600K, V600D и V600E2). Подробную информацию см. в разделе «Оценка рабочих характеристик на неклинических образцах меланомы».
14. Образцы FFPEТ, содержащие разрушенную ДНК, могут повлиять на способность теста обнаруживать мутацию.
15. Тест на мутации **cobas** 4800 BRAF Mutation Test является качественным тестом. Этот тест не предназначен для количественного определения мутации.

I. ОЦЕНКА РАБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК

ОЦЕНКА РАБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК НА НЕКЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Для неклинических исследований, описанных ниже, процент опухолевого содержимого оценивался путем гистологического исследования, содержание меланина оценивалось путем гистологического исследования и самостоятельного анализа на определение меланина. Для отбора образцов для тестирования использовалось двунаправленное секвенирование по Сэнгеру. Процент мутации определялся с использованием 454-секвенирования (количественного метода массового параллельного пиросеквенирования).

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность. Предел обнаружения (LoD)

Минимальное количество входящей ДНК, которое давало правильные результаты в 95 % случаев, было оценено с использованием панелей разведений, подготовленных из трех типов образцов:

- Смеси образцов, подготовленные путем смешения образцов исходной ДНК, полученных из образцов FFPEТ с мутацией V600E гена BRAF и образцов FFPEТ с диким типом гена BRAF, для достижения определенного уровня мутации.
- Отдельные образцы исходной ДНК из FFPEТ, подготовленные из трех образцов FFPEТ с мутацией V600E гена BRAF.
- Смесь клеточных линий, подготовленная путем смешения образцов исходной ДНК, полученных из клеточной линии с мутацией V600E гена BRAF и клеточной линии с диким типом гена BRAF.

Все образцы, использованные в этом исследовании, были секвенированы путем 454-секвенирования, чтобы определить процент мутации в каждом образце.

Аналитическая чувствительность, определенная с использованием смесей образцов

Исходные ДНК образца FFPET с мутацией V600E гена BRAF были смешаны с исходными ДНК образца FFPET с диким типом гена BRAF, чтобы получить один образец с содержанием мутации ~10 %, три образца — ~5 % и один образец — ~3 %. Также был протестирован один образец с диким типом гена BRAF. После смешения уровни мутаций проверяли путем 454-секвенирования. Затем каждую из пяти смесей образцов с мутацией V600E (но не образец дикого типа) разводили, чтобы получить образцы панели, подробно описанные в Табл. 3.

Табл. 3
Подготовка образцов панели разведения из смесей образцов

Смесь	Средний процент мутации *	Количество ДНК в образцах панели разведения (нг/25 мкл) **
10%-ная смесь	9 % (n = 6)	125; 62,5; 31,3
5%-ная смесь 1	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
5%-ная смесь 2	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
5%-ная смесь 3	6 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
2,5%-ная смесь	3 % (n = 5)	125; 62,5; 31,3
0 % (только дикий тип)	—	125

* Средний процент мутации в смеси, тестированный 454-секвенированием.

** Количество геномной ДНК, содержащейся в каждом образце панели. 25 мкл — это внесенный объем образца для каждого теста.

Постановка восьми (8) повторов каждого образца панели проводилась с использованием каждого из 3 лотов набора для теста **cobas BRAF** (n = 24/образец панели). Табл. 4 демонстрирует чувствительность каждой смеси FFPEТ, определенную по наименьшему количеству ДНК, обеспечивающему частоту результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для мутации V600E гена BRAF не менее 95 % (затемненные строки).

Табл. 4
Чувствительность теста cobas BRAF при использовании смесей FFPEТ

Смесь FFPEТ	Процент мутации методом 454-секвенирования	Количество ДНК в образцах панели	Частота результата «Mutation Detected» (n = 24)
10%-ная смесь FFPEТ	9 %	125 нг/25 мкл	100 %
		62,5 нг/25 мкл	100 %
		31,3 нг/25 мкл	100 %
5%-ная смесь FFPEТ 1	5 %	125 нг/25 мкл	96 %
		5,0 нг/25 мкл	100 %
		2,5 нг/25 мкл	100 %
		1,3 нг/25 мкл	75 %
		0,6 нг/25 мкл	88 %
		0,3 нг/25 мкл	71 %
5%-ная смесь FFPEТ 2	5 %	125 нг/25 мкл	100 %
		5,0 нг/25 мкл	92 %
		2,5 нг/25 мкл	100 %
		1,3 нг/25 мкл	96 %
		0,6 нг/25 мкл	58 %
		0,3 нг/25 мкл	50 %
5%-ная смесь FFPEТ 3	6 %	125 нг/25 мкл	100 %
		5,0 нг/25 мкл	100 %
		2,5 нг/25 мкл	100 %
		1,3 нг/25 мкл	100 %
		0,6 нг/25 мкл	96 %
		0,3 нг/25 мкл	71 %
2,5%-ная смесь FFPEТ	3 %	125 нг/25 мкл	0 %
		62,5 нг/25 мкл	4 %
		31,3 нг/25 мкл	4 %
0 % (дикий тип)	—	125 нг/25 мкл	0 %

Это исследование показывает, что тест **cobas BRAF** может обнаруживать мутацию V600E гена BRAF при уровне мутации ≥ 5 % при стандартном количестве внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста обнаруживать мутацию при меньших количествах внесенной ДНК показывает, что если образцы будут содержать ДНК, разрушенную после фиксации, мутация все равно будет обнаружена. Все результаты теста образца дикого типа гена BRAF были «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена).

Аналитическая чувствительность, определенная с использованием образцов FFPET

Чтобы подтвердить заявленную способность к обнаружению мутации при уровне 5 % в образцах пациентов, сорок восемь отдельных срезов толщиной 5 мкм из 3 образцов FFPET с мутацией V600E гена BRAF, содержащих 6 %, 12 % и 4 % мутантных последовательностей, обрабатывали индивидуально с использованием 3 лотов набора для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit с целью выделения ДНК. Чтобы оценить влияние меланина на тест, один образец (6 % мутации) имел высокую концентрацию меланина. Из каждого среза готовили серию разведений ДНК, чтобы получить комплект из 6 образцов, как описано в Табл. 5.

Табл. 5
Подготовка образцов панели разведения из образцов FFPET

Образец FFPET	Информация об образце		Количество ДНК в образцах панели разведения (нг/25 мкл)
	Средний процент мутации V600E *	Пигментация	
Образец 1	6 %	Сильно пигментированный **	125; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0
Образец 2	12 %	СП ***	125; 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5
Образец 3	4 %	СП	125; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0

* Средний процент мутации в образце, определенный 454-секвенированием.

** Сильно пигментированный на основании визуальной оценки, концентрация меланина = 0,17 мкг/25 мкл

*** СП = слабо пигментированный на основании визуальной оценки

Постановка шестнадцати (16) повторов каждого образца панели проводилась с использованием каждого из 3 лотов набора для теста **cobas** BRAF (n = 48/образец панели). Чувствительность для каждого образца FFPET была определена по наименьшему количеству ДНК, обеспечивающему частоту результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для мутации V600E гена BRAF не менее 95 % (затемненные строки). Результаты исследования приведены в Табл. 6.

Табл. 6
Чувствительность теста cobas BRAF при использовании образцов FFPET

Образец FFPET	Процент мутации методом 454-секвенирования	Количество ДНК в образцах панели	Частота результата «Mutation Detected» (n = 48)
Образец 1	6 %	125 нг/25 мкл	100 %
		15,6 нг/25 мкл	100 %
		7,8 нг/25 мкл	98 %
		3,9 нг/25 мкл	98 %
		2,0 нг/25 мкл	81 %
		1,0 нг/25 мкл	71 %
Образец 2	12 %	125 нг/25 мкл	100 %
		7,8 нг/25 мкл	100 %
		3,9 нг/25 мкл	100 %
		2,0 нг/25 мкл	98 %
		1,0 нг/25 мкл	98 %
		0,5 нг/25 мкл	94 %
Образец 3	4 %	125 нг/25 мкл	98 %
		31,3 нг/25 мкл	98 %
		15,6 нг/25 мкл	85 %
		7,8 нг/25 мкл	90 %
		3,9 нг/25 мкл	90 %
		2,0 нг/25 мкл	67 %

Это исследование показывает, что тест **cobas** BRAF может обнаруживать мутацию V600E гена BRAF в реальных клинических образцах FFPET при уровне мутации $\geq 5\%$ при стандартном количестве внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста обнаруживать мутацию при меньших количествах внесенной ДНК показывает, что если образцы будут содержать ДНК, разрушенную после фиксации, мутация все равно будет обнаружена. Один сильно пигментированный образец, включенный в исследование, не продемонстрировал влияния на чувствительность теста.

Аналитическая чувствительность, определенная с использованием смесей клеточных линий

Исходные ДНК из двух клеточных линий меланомы [SK-MEL 28 (с мутацией V600E гена BRAF) и SK-MEL 2 (с исходным немутантным типом гена BRAF)] были смешаны для получения образца с 5 % мутации, подтвержденной путем 454-секвенирования. Было подготовлено три отдельные панели разведения, содержащих от 125 нг/25 мкл до нуля нг/25 мкл ДНК. Постановка двадцати (20) повторов каждого образца панели проводилась с использованием каждого из 3 лотов набора для теста **cobas** BRAF (всего 60 повторов). Чувствительность была определена по наименьшему количеству ДНК, обеспечивающему частоту результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для мутации V600E гена BRAF не менее 95 % (затемненная строка). Результаты исследования приведены в Табл. 7.

Табл. 7

Чувствительность теста cobas BRAF при использовании смеси клеточных линий

Смесь клеточных линий	Средний процент мутации методом 454-секвенирования	Количество ДНК в образцах панели	Частота результата «Mutation Detected» (n = 60)
Смесь клеточных линий	5 %	125,0 нг/25 мкл	97 %
		31,3 нг/25 мкл	100 %
		15,6 нг/25 мкл	95 %
		7,8 нг/25 мкл	98 %
		3,9 нг/25 мкл	95 %
		2,0 нг/25 мкл	82 %
		1,0 нг/25 мкл	78 %
		0,5 нг/25 мкл	77 %

Тест **cobas** BRAF дал результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) с частотой 95 % при 3,9 нг/25 мкл, что соответствует разведению 1:32 от рекомендованного количества внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Это указывает, что тест будет обнаруживать мутацию V600E гена BRAF, если ~97 % ДНК разрушено вследствие процесса фиксации, при условии, что ДНК клеточной линии содержит 100 % интактной ДНК, способной к амплификации.

Диапазон количества геномной ДНК

Рекомендованное количество внесенной ДНК для теста **cobas** BRAF составляет 125 нг. Различия в количестве внесенной геномной ДНК могут быть обусловлены ошибками количественного определения ДНК и (или) разной степенью разрушения ДНК. Чтобы оценить эффекты различных количеств внесенной геномной ДНК, выделяли геномную ДНК из 11 меланомных образцов FFPET, выбранных по их мутационному статусу и уровню пигментации, и готовили серию разведений до концентрации 250, 125, 62,5 и 31,3 нг/25 мкл. Все 4 уровня ДНК оценивались с помощью 2 лотов. Результаты анализа всех уровней внесенной геномной ДНК были ожидаемыми.

Минимальное содержание опухоли

Тридцать три (33) образца с мутацией V600E гена BRAF протестированы с целью определения минимальной пропорции опухоли, необходимой для детекции мутации V600E гена BRAF в образцах с содержанием опухоли 5–50 % без макродиссекции. Один (1) срез из каждого образца протестирован с использованием теста **cobas** BRAF.

Тест **cobas** BRAF верно обнаружил все образцы с мутацией V600E гена BRAF при содержании мутантной ДНК более 5 % и минимальном содержании опухоли не менее 15 %, как показано в Табл. 8. Образцы с содержанием опухоли менее 15 % и уровнем мутации менее 5 % были зарегистрированы как «Мутация не обнаружена». Дополнительные 24 образца дикого типа с содержанием опухоли 5–45 % оценивались при рекомендованной концентрации внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Все образцы с диким уровнем были определены верно. Для образцов с содержанием опухоли по площади < 50 % требуется макродиссекция.

Табл. 8

Результаты тестирования 33 образцов с мутацией V600E гена BRAF и различным содержанием опухоли и мутации

Номер образца	Содержание опухоли *	% мутации	Результат теста
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

Номер образца	Содержание опухоли *	% мутации	Результат теста
8	15 % / 15 %	3 %	Mutation Detected
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

* Содержание опухоли в образце оценивалось путем рассмотрения патологоанатомом первого и последнего из двенадцати последовательных срезов толщиной 5 мкм из каждого образца. Показано содержание опухоли в первом и последнем срезе (например, 95 % / 95 %).

Перекрестная реактивность

Перекрестная реактивность теста **cobas BRAF** оценивалась путем тестирования следующих типов образцов:

- FFPET образцы меланомы с мутациями гена BRAF, не относящимися к V600E, с различным уровнем мутации;
- плазмиды, содержащие ген BRAF с мутациями, не относящимися к V600E;
- плазмиды, содержащие гомологи гена BRAF;
- кожные микроорганизмы.

Перекрестную реактивность также оценивали, определяя, оказывало ли присутствие плазмид, содержащих гомолог BRAF, или кожных микроорганизмов, интерферирующее влияние на детекцию мутации V600E гена BRAF.

Образцы FFPET с меланомой, содержащие мутацию гена BRAF, не относящуюся к V600E

Четырнадцать (14) образцов FFPET с меланомой, содержащих мутации гена BRAF, не относящиеся к V600E (V600D, V600E2, V600R или V600K) протестированы в трех повторах с помощью теста **cobas BRAF**. Для восьми образцов с мутациями гена BRAF, не относящимся к V600E, все три повтора показали перекрестную реактивность с тестом **cobas BRAF**. Эти восемь образцов имели мутацию V600D гена BRAF (18 % мутации), мутацию V600E2 гена BRAF (68 % мутации) или мутацию V600K гена BRAF (более 30 % мутации). Перекрестная реактивность не наблюдалась для образцов с мутацией V600R гена BRAF (23 % мутации), как показано в Табл. 9.

Табл. 9**Частота мутаций, обнаруженная тестом cobas BRAF при анализе образцов FFPET с мутациями гена BRAF, не относящимися к V600E**

Номер образца	Статус мутации гена BRAF	Процент мутации	Содержание опухоли *	Стадия опухоли	Частота обнаружения мутации (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
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 %	II C	100 %
13		62 %	75 % / 75 %	IV	100 %
14	69 %	80 % / 80 %	IV	100 %	

* Содержание опухоли в образце оценивалось путем рассмотрения патологоанатомом первого и последнего из двенадцати последовательных срезов толщиной 5 мкм из каждого образца. Показано содержание опухоли в первом и последнем срезе (например, 95 % / 95 %).

Была подготовлена панель разведений из одиннадцати образцов с концентрациями ДНК от 5,0 нг/мкл до 0,0049 нг/мкл (что соответствует количеству от 125 до 0,1 нг ДНК в 25 мкл для теста). Каждый образец панели протестирован в трех повторах, чтобы определить наименьшее количество ДНК, дающее 100%-ную частоту обнаружения мутации для восьми образцов, продемонстрировавших перекрестную реактивность в тесте **cobas BRAF**. Наименьшее количество внесенной ДНК, при котором еще наблюдалась перекрестная реактивность, варьировало от 0,5 нг/25 мкл для образца с мутацией V600K гена BRAF с 69 % мутации до 15,6 нг/25 мкл для образца с мутацией V600D гена BRAF с 18 % мутации (Табл. 10).

Табл. 10**Наименьшее количество ДНК, при котором еще наблюдалась перекрестная реактивность в тесте cobas BRAF**

Номер образца	Статус мутации гена BRAF	Процент мутации	Наименьшее количество ДНК, при котором еще наблюдалась перекрестная реактивность (n = 3)
1	V600D	18 %	15,6 нг/25 мкл
2	V600E2	68 %	7,8 нг/25 мкл
3	V600K	31 %	3,9 нг/25 мкл
4		35 %	3,9 нг/25 мкл
5		39 %	3,9 нг/25 мкл
6		36 %	2,0 нг/25 мкл
7		62 %	3,9 нг/25 мкл
8		69 %	0,5 нг/25 мкл

Плазмиды, содержащие ген BRAF без мутации V600E

Панели разведений плазмид с уровнями мутации в диапазоне от 5 % до 75 % на фоне дикого типа плазмиды были подготовлены для следующих девяти мутаций гена BRAF, отличных от V600E: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K и V600R. Три повтора каждого образца панели разведений были подготовлены для каждой плазмиды и протестированы с использованием теста **cobas** BRAF. Перекрестная реактивность обнаружена во всех 3 повторах для плазмиды, содержащей ген BRAF с мутацией V600D при ≥ 10 % мутации, плазмиды, содержащей ген BRAF с мутацией V600K при ≥ 35 % мутации и плазмиды, содержащей ген BRAF с мутацией V600E2 при ≥ 65 % мутации. Перекрестная реактивность не наблюдалась с плазмидами, содержащими ген BRAF с шестью остальными исследованными мутациями.

Плазмиды, содержащие гомологи гена BRAF

Готовили образцы трех плазмид, содержащих гомологи гена BRAF (псевдоген BRAF, ARAF и RAF1), плазмиды, содержащей ген BRAF с мутацией V600E и плазмиды, содержащей дикий тип гена BRAF, как показано в Табл. 11. От трех до шести повторов каждого образца панели были протестированы с помощью теста **cobas** BRAF.

Табл. 11
Образцы плазмид, содержащих гомолог гена BRAF

Панель		Состав по объему	
Название	Образец	Компонент 1	Компонент 2
Псевдоген BRAF	1	95 % псевдогена BRAF	5 % мутации V600E гена BRAF
	2	100 % псевдогена BRAF	—
ARAF	1	95 % ARAF	5 % мутации V600E гена BRAF
	2	100 % ARAF	—
RAF1	1	95 % RAF1	5 % мутации V600E гена BRAF
	2	100 % RAF1	—
Контроль	1	95 % гена BRAF (только дикий тип)	5 % мутации V600E гена BRAF
	2	100 % гена BRAF (только дикий тип)	—
	3	95 % буфера для элюции ДНК	5 % мутации V600E гена BRAF

Ни одна из трех плазмид, содержащих гомолог гена BRAF и протестированных отдельно, не была обнаружена тестом **cobas** BRAF, что указывает на отсутствие перекрестной реактивности теста с плазмидами, содержащими гомолог гена BRAF.

Исследование плазмиды, содержавшей мутацию V600E гена BRAF в количестве 5 % в присутствии 95 % плазмиды, содержащей гомолог гена BRAF, показало ожидаемые результаты «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) во всех случаях, что указывает на отсутствие интерферирующего влияния гомологичных плазмид на детекцию мутации V600E гена BRAF.

Кожные микроорганизмы

Следующие кожные микроорганизмы показали отсутствие перекрестной реактивности в тесте **cobas** BRAF при добавлении к образцу FFPET с меланомой дикого типа в количестве 1×10^6 колониеобразующих единиц (CFU) во время этапа лизиса ткани:

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

Протестированные микроорганизмы также не оказывали интерферирующего влияния на детекцию образца FFPET с 8 % мутации V600E гена BRAF при внесении 1×10^6 колониеобразующих единиц (CFU) на этапе лизиса ткани.

Интерференция

Триглицериды (≤ 74 мМ, двукратная рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷), гемоглобин (≤ 2 мг/мл, однократная рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) и ≤ 95 % некротизированной ткани не интерферируют с тестом **cobas** BRAF при внесении потенциально интерферирующего вещества на этапе лизиса ткани во время пробоподготовки.

Меланин

Вклад высоких концентраций эндогенного меланина оценивался с помощью сильно пигментированных образцов FFPET с меланомой. Всего был отобран 41 уникальный образец FFPET с меланомой на основании уровня пигментации. Из них 33 были сильно пигментированы, 3 были получены от афро-американцев, и 5 имели слабую

пигментацию для сравнения. Из ткани выделяли ДНК и определяли концентрацию меланина в каждом образце. Исходные ДНК, полученные из каждого из двух срезов каждого из 41 образца, тестировали однократно. Три образца показали невалидные результаты. Один образец показал результат «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена), однако было определено, что он находится ниже предела обнаружения. 3 образца с результатами «Невалидный» использовались для подготовки рекомендованной концентрации ДНК для теста, а также двухкратного, четырехкратного и восьмикратного разведения рекомендованного количества ДНК 125 нг/ПЦР. Полученные в результате разведенные образцы ДНК (содержащие всего 125 нг, 61,5 нг, 31,25 нг или 15,6 нг ДНК в 25 мкл) были протестированы, чтобы определить, позволяет ли соответствующее уменьшение концентрации меланина путем разведения получать валидные результаты. Все три образца, разведенные в два раза, продемонстрировали верные результаты.

Табл. 12

Общие показатели теста cobas BRAF на образцах FFPE с пигментированной меланомой

Идентификатор образца	Разведение	Количество меланина в образце/ПЦР	Результат
1	Нет (125 нг)	0,15 мкг	Invalid/Invalid
	В два раза (62,5 нг)	0,08 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
	В четыре раза (31,3 нг)	0,04 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
	В восемь раз (15,6 нг)	0,02 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Нет (125 нг)	0,24 мкг	Invalid/Invalid
	В два раза (62,5 нг)	0,12 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
	В четыре раза (31,3 нг)	0,06 мкг	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	В восемь раз (15,6 нг)	0,03 мкг	Mutation Not Detected/Invalid
3	Нет (125 нг)	0,34 мкг	Invalid/Invalid
	В два раза (62,5 нг)	0,17 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
	В четыре раза (31,3 нг)	0,08 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected
	В восемь раз (15,6 нг)	0,04 мкг	Mutation Detected/Mutation Detected

По результатам тестирования 17 образцов дикого типа все образцы дали верный результат «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена), за исключением 2 сильно пигментированных образцов, которые показали ложноположительные результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Воспроизводимость

Проведено исследование для оценки воспроизводимости теста **cobas BRAF** между 3 внешними лабораториями (2 оператора в каждой лаборатории), 3 лотами набора реагентов и 5 днями тестирования (не подряд) с панелью из 8 образцов ДНК, выделенными из срезов FFPE со злокачественной меланомой. Данная панель включала пигментированные и непигментированные образцы, диапазоны процентного содержания опухоли и мутантных аллелей, включая один образец с содержанием на уровне предела обнаружения (LoD) 5 %. Из 94 постановок 92 (97,9 %) были валидными. Из 1442 протестированных образцов 2 образца (0,14 %) дали невалидные результаты. Для всех образцов панели, за исключением образцов LoD, верный результат был получен для 100 % валидных тестов, включая образцы панели с 20 % мутации и два сильно пигментированных образца панели. При исследовании образцов панели LoD мутация V600E была обнаружена в 90 % (162/180) образцов. Среди протестированных образцов дикого типа не было ложноположительных. В итоге тест **cobas® BRAF** показал высокую воспроизводимость как на пигментированных, так и на непигментированных образцах, на образцах с низким содержанием опухоли и низким процентным содержанием мутантных аллелей, между лабораториями, операторами, лотами набора реагентов и днями тестирования. Аналитическая специфичность составила 100 %.

Корреляция с эталонным методом для образцов клинического исследования фазы III

Распространенность мутации V600E в клиническом исследовании фазы III составила 46,5 % на основании результатов теста **cobas** BRAF. Это согласуется с распространенностью мутации V600E у пациентов с меланомой по данным литературы.

Чтобы оценить показатели теста **cobas** BRAF в сравнении с 2× двунаправленным секвенированием по Сэнгеру, из 596 последовательных пациентов, прошедших скрининг для клинического исследования вемурафениба фазы III, отобрали тех, у которых были собраны клинические и демографические данные, а также результаты секвенирования по Сэнгеру. Из этих случаев 94 были непригодными из-за отсутствия критериев включения, 4 случая не имели патологического заключения, и в 2 случаях результаты теста **cobas** BRAF были невалидными. Из оставшихся 496 случаев 47 образцов имели невалидные результаты секвенирования по Сэнгеру, т. е. оценке поддавалось 449 случаев. Анализ согласованности между результатами теста **cobas** BRAF и результатами секвенирования по Сэнгеру для детекции мутации V600E показан в Табл. 13 ниже.

Табл. 13

Общие показатели теста **cobas** BRAF в сравнении с секвенированием по Сэнгеру

Тест cobas BRAF (исследуемый метод)	Секвенирование по Сэнгеру (эталонный метод)		
	Мутация V600E гена BRAF обнаружена ^а	Мутация V600E гена BRAF не обнаружена ^б	Всего
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Всего	222	227	449
Процент согласованности положительных результатов (95 % ДИ)	100 % × 216/222 = 97,3 % (94,2 %, 98,8 %)		
Процент согласованности отрицательных результатов (95 % ДИ)	100 % × 192/227 = 84,6 % (79,3 %, 88,7 %)		
Общий процент согласованности (95 % ДИ)	100 % × 408/449 = 90,9 % (87,8 %, 93,2 %)		

^а Результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) указывает на присутствие преобладающего типа мутации гена BRAF, V600E (1799 T>A), согласно результатам секвенирования по Сэнгеру.

^б Результат «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена) указывает на отсутствие преобладающего типа мутации гена BRAF, V600E, согласно результатам секвенирования по Сэнгеру (например, дикий тип, нет мутации либо мутация V600D, V600E2, V600K, V600R или другая).

Примечание. Образцы меланомы с валидной парой результатов теста **cobas** BRAF и секвенирования по Сэнгеру.

Примечание. ДИ — (показатель) доверительный интервал.

Каждый из 41 образца, давший противоречивые результаты теста **cobas** BRAF и секвенирования по Сэнгеру, был подвергнут 454-секвенированию (количественному массово параллельному пиросеквенированию) как второму эталонному методу. Дополнительно 33 образца, согласующихся по тесту **cobas** BRAF и секвенированию по Сэнгеру, были протестированы 454-секвенированием. Второй анализ согласованности после разрешения противоречий представлен в Табл. 14.

В 5 из 6 образцов с несогласующимися результатами «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена) при тесте **cobas** BRAF и «мутация V600E» при секвенировании по Сэнгеру, 454-секвенирование выявило дикий тип (один образец дал невалидный результат).

В 8 из 35 образцов с несогласующимися результатами «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) при тесте **cobas** BRAF и «дикий тип» при секвенировании по Сэнгеру, 454-секвенирование выявило мутацию V600E в 7 из 8 образцах (1 образец дал невалидный результат).

Из 27/35 образцов с несогласующимися результатами «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) при тесте **cobas** BRAF и «мутация отличная от V600E» при секвенировании по Сэнгеру, 454-секвенирование выявило мутацию V600K в 24 образцах, V600E2 в одном образце и V600E в одном образце. В 1 образце секвенирование по Сэнгеру выявило мутацию V600D, а 454-секвенирование обнаружило дикий тип.

Перекрестная реактивность теста **cobas** BRAF для мутации V600K составила 66 % (25/38).

Согласованность 454-секвенирования составила 100 % для 33 образцов с мутацией V600E и диким типом, согласующихся по результатам теста **cobas** BRAF и секвенирования по Сэнгеру.

Табл. 14
Результаты теста cobas BRAF и секвенирования по Сэнгеру после разрешения противоречий методом 454-секвенирования

Тест cobas BRAF (исследуемый метод)	После разрешения противоречий методом 454-секвенирования		
	Мутация V600E гена BRAF обнаружена	Мутация V600E гена BRAF не обнаружена	Всего
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Всего	225	224	449
Процент согласованности положительных результатов (95 % ДИ)	100 % × 224/225 = 99,6 % (97,5 %, 99,9 %)		
Процент согласованности отрицательных результатов (95 % ДИ)	100 % × 197/224 = 87,9 % (83,0 %, 91,6 %)		
Общий процент согласованности (95 % ДИ)	100 % × 421/449 = 93,8 % (91,1 %, 95,7 %)		

Распределение мутаций кодона 600 гена BRAF

Распределение мутаций кодона 600 определялось в 496 валидных случаях на основании совокупности результатов секвенирования по Сэнгеру и 454-секвенирования. В 182 случаях из этих 496 был дикий тип, и в 314 случаях был мутантный. Распределений мутаций кодона 600 среди 314 положительных случаев отражено в Табл. 15. Мутации V600K были определены в 13,4 % всех случаев мутаций кодона 600.

Табл. 15
Распределение мутаций кодона 600 гена BRAF в мутация-положительной популяции по результатам секвенирования по Сэнгеру и (или) 454-секвенирования

Аминокислотная последовательность (кодон 600)	Нуклеотидная последовательность (1798–1800)	N	% распределения
V600E	ГАГ	255	81,2
V600K	ААГ	42	13,4
V600E2	ГАА	13	4,1
V600R	АГГ	3	1,0
V600D	ГАГ	1	0,3
Всего мутаций кодона 600		314	100
Всего дикого типа кодона 600		182	—

Клиническая эффективность ZELBORAF® (вемурафениб) ⁹

Тест **cobas BRAF** использовался как дополнительный тест для отбора пациентов для лечения препаратом ZELBORAF®. Клиническая безопасность и эффективность препарата ZELBORAF® продемонстрирована в исследовании NO25026 (BRIM3), международном рандомизированном открытом контролируемом многоцентровом исследовании фазы III на пациентах, ранее не получавших лечения, с неоперабельной меланомой стадии III C или IV, с мутацией V600E гена BRAF, с целью оценки клинической эффективности препарата ZELBORAF® в сравнении с дакарбазином (стандартным лечением). Образцы FFPE от всех пациентов с меланомой, рассматриваемых для лечения, были исследованы с помощью теста **cobas BRAF**. Пациенты с результатом теста «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) были пригодны для включения в исследование лекарственного препарата, если они соответствовали другим критериям пригодности. Пациенты с результатом теста «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена) были непригодны для включения в исследование лекарственного препарата. Исследование было проведено приблизительно в 104 лабораториях по всему миру (22 центра в США).

В исследование было включено 675 пациентов: 337 получало вемурафениб, и 338 получало дакарбазин. Основным показателем эффективности в исследовании была общая выживаемость (ОВ) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) по оценке исследователя. Другие критерии эффективности включали частоту подтвержденного по оценке исследователя наилучшего общего ответа.

Исходные характеристики были сбалансированы между группами лечения. Большинство пациентов были мужчинами (56 %), представителями европеоидной расы (99 %), медиана возраста составила 54 года (24 % ≥ 65 лет). Все пациенты имели показатель общего состояния по шкале ECOG 0 или 1, у большинства пациентов наблюдалось метастазирование (95 %).

Результаты эффективности в исследовании показаны в Табл. 16 ниже и на Рис. 2.

Табл. 16
Эффективность вемурафениба у пациентов, ранее не получавших лечение, с меланомой, положительной по мутации BRAFV600E^a

	Вемурафениб (N = 337)	Дакарбазин (N = 338)	Значение p [†]
Общая выживаемость			
Количество смертей	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Отношение рисков (95 % ДИ) ^б	0,44 (0,33; 0,59)		< 0,0001
Медиана выживаемости (месяцы) (95 % ДИ) ^в	НД ^а (9,6; НД)	7,9 (7,3; 9,6)	-
Медиана периода наблюдения (месяцы) (диапазон)	6,2 (0,4; 13,9)	4,5 (< 0,1; 11,7)	
Выживаемость без прогрессирования Отношение рисков (95 % ДИ) ^б	0,26 (0,20; 0,33)		< 0,0001
Медиана ВБП (месяцы) ^в	5,3 (4,9; 6,6)	1,6 (1,6; 1,7)	-

^а Согласно результату теста **cobas** BRAF.

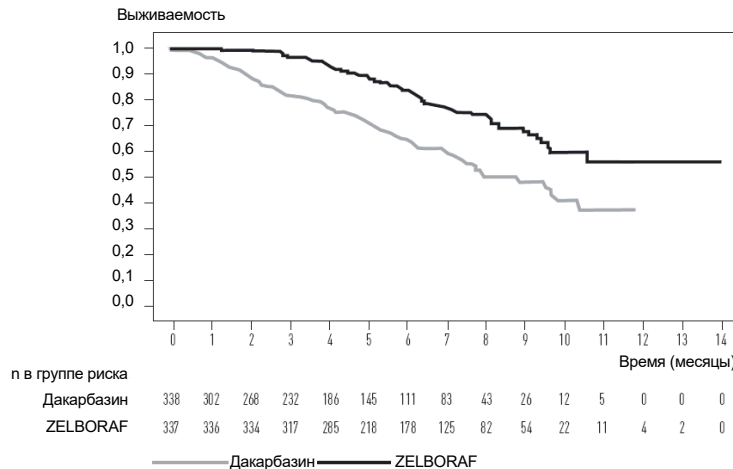
^б Отношение рисков оценивалось с использованием модели Кокса; отношение рисков < 1 свидетельствовало в пользу вемурафениба.

^в Расчет по методу Каплан-Мейера.

[†] Нестратифицированный логарифмический ранговый критерий.

^а Не достигнуто.

Рис. 2
График кривой общей выживаемости, полученной по методу Каплана-Мейера для пациентов, ранее не получавших лечение



Частота подтвержденного по оценке исследователя наилучшего общего ответа составила 48,4 % (95 % ДИ: 41,6 %, 55,2 %) в группе препарата ZELBORAF® по сравнению с 5,5 % (95 % ДИ: 2,8 %, 9,3 %) в группе дакарбазина.

Клиническая эффективность COTELLIC® (кобиментиб)^{10, 11}

Препарат COTELLIC®, ингибитор MEK, протестирован в клиническом исследовании (coBRIM) в сочетании с препаратом ZELBORAF® по сравнению с препаратом ZELBORAF® плюс плацебо. Тест **cobas** BRAF использовался для определения пригодности пациентов для включения в это клиническое исследование. Безопасность и эффективность комбинации препаратов COTELLIC® и ZELBORAF® установлена в многоцентровом рандомизированном (1:1) двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании с участием 495 пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой с мутацией V600 гена BRAF, ранее не получавших лечения. Основным показателем эффективности была выживаемость без прогрессирования (ВБП) по оценке исследователя согласно RECIST v 1.1. Дополнительными показателями эффективности были подтвержденная частота объективного ответа (ЧОО) по оценке исследователя, общая выживаемость (ОВ), ВБП согласно независимой централизованной оценке в слепом режиме и длительность ответа (ДО).

Исходные характеристики были сбалансированы между группами лечения. Большинство пациентов были мужчинами (58 %), представителями европеоидной расы (93 %), медиана возраста составила 55 лет, 72 % пациентов имели показатель общего состояния по шкале ECOG 0 и у 60 % пациентов была стадия болезни M1c.

Образцы FFPE от всех пациентов, рассматриваемых для лечения, были исследованы с помощью теста **cobas** BRAF. Пациенты с результатом «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) были пригодны для включения в исследование, если они соответствовали другим критериям пригодности. Пациенты с результатом «No Mutation Detected» (Ни одна

мутация не обнаружена) были непригодны для включения в исследование. Исследование включало пациентов с мутациями V600K гена BRAF, обнаруженными тестом **cobas** BRAF, и продемонстрировало безопасность и эффективность терапевтического препарата в части популяции пациентов с опухолями, содержащими выявленную мутацию V600K.

Результаты эффективности в исследовании показаны в Табл. 17 ниже и на Рис. 3.

Табл. 17
Эффективность кобиметиниба в сочетании с вемурафенибом у пациентов с меланомой, положительной по мутации гена BRAF^a

	Кобиметиниб + вемурафениб (N = 247)	Плацебо + вемурафениб (N = 248)	Значение p
Выживаемость без прогрессирования (по оценке исследователя)			
Число случаев (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Прогрессирование	131	169	
Смерть	12	11	
Медиана ВБП (месяцы) (95 % ДИ)	12,3 (9,5; 13,4)	7,2 (5,6; 7,5)	
Отношение рисков (95 % ДИ) ^б	0,56 (0,45; 0,70)		< 0,001 ^г
Общая выживаемость			
Количество смертей (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Медиана выживаемости (месяцы) (95 % ДИ) ^в	Оценка невозможна (20,7, оценка невозможна)	17,0 (15,0, оценка невозможна)	-
Отношение рисков (95 % ДИ) ^б	0,63 (0,47; 0,85)		0,0019 ^{г, д}
Частота объективного ответа			
Частота объективного ответа (95 % ДИ) ^в	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Полная ремиссия	16 %	10 %	
Неполная ремиссия	54 %	40 %	
Медиана длительности ответа, месяцы (95 % ДИ) ^в	13,0 (11,1; 16,6)	9,2 (7,5; 12,8)	-

^a Согласно результату теста **cobas** BRAF.

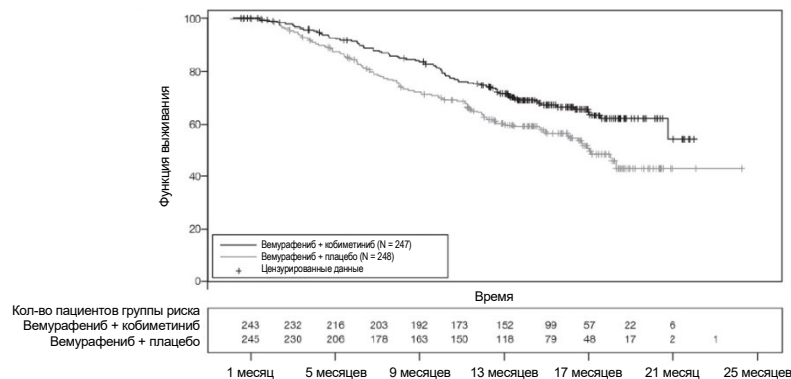
^б Отношение рисков оценивалось с использованием модели Кокса; отношение рисков < 1 свидетельствовало в пользу кобиметиниба + вемурафениба.

^в Расчет по методу Каплан-Мейера.

^г Стратифицированный логарифмический ранговый критерий.

^д Статистическая значимость в зависимости от сравнения с назначенным значением альфа 0,019 для этого промежуточного анализа.

Рис. 3
График кривой общей выживаемости, полученной по методу Каплана-Мейера



Доступные образцы опухолей от рандомизированных пациентов были ретроспективно проанализированы с использованием секвенирования нового поколения (NGS) для дальнейшей классификации мутаций гена BRAF как V600E или V600K; результаты получены у 81 % рандомизированных пациентов (400/495). Из 400 пациентов, которым было

успешно проведено NGS, у 56 (14 %) опухолей имели мутации V600K гена BRAF, а у остальных пациентов были опухоли с мутациями V600E гена BRAF. В 56 опухолях, в которых ретроспективно обнаружена мутация V600K гена BRAF, частота мутаций в этом анализе составляла от 5,1 до 36,6 %. В исследуемых подгруппах анализа ВБП, ОБ и ЧОО для подтипов мутации V600 гена BRAF у 81 % пациентов в этом исследовании, у которых был определен тип мутации V600 гена BRAF, наблюдалась тенденция в пользу комбинации кобиметиниба с вемурафенибом.

II. ПАПИЛЛЯРНАЯ КАРИНОМА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ПКЩЖ)

ОЦЕНКА РАБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК НА НЕКЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Для доклинических исследований, описанных ниже, характеристики опухоли, такие как процент содержания опухоли, оценивались путем рассмотрения гистологических препаратов. Для отбора образцов для тестирования использовалось двунаправленное секвенирование по Сэнгеру. Процент мутации определялся с использованием 454-секвенирования (количественного метода массового параллельного пиросеквенирования).

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность. Предел обнаружения (LoD)

Минимальное количество входящей ДНК, которое давало правильные результаты в 95 % случаев, было оценено с использованием панелей разведений, подготовленных из двух типов образцов:

- Смеси образцов, подготовленные путем смешения образцов исходной ДНК, полученных из образцов FFPET с мутацией V600E гена BRAF и образцов FFPET с диким типом гена BRAF, для достижения определенного уровня мутации.
- Отдельные исходные ДНК из FFPET, подготовленные из двух образцов FFPET с мутацией V600E гена BRAF.

Все образцы, использованные в этом исследовании, были секвенированы путем 454-секвенирования, чтобы определить процент мутации в каждом образце.

Аналитическая чувствительность, определенная с использованием смесей образцов

Исходные ДНК образца FFPET с мутацией V600E гена BRAF были смешаны с исходными ДНК образца FFPET с диким типом гена BRAF, чтобы получить один образец с содержанием мутации ~10 %, один образец — ~5 % и один образец — ~2 %. После смешения уровни мутаций проверяли путем 454-секвенирования. Затем каждую из трех смесей образцов с мутацией V600E разводили, чтобы получить образцы панели, подробно описанные в Табл. 18.

Табл. 18
Подготовка образцов панели разведения из смесей образцов

Смесь	Средний процент мутации *	Количество ДНК в образцах панели разведения (нг/25 мкл) **
10%-ная смесь	10 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
5%-ная смесь	5 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
2,5%-ная смесь	2 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
0 % (только дикий тип)	—	125

* Средний процент мутации в смеси, тестированный 454-секвенированием.

** Количество геномной ДНК, содержащейся в каждом образце панели. 25 мкл — это внесенный объем образца для каждого теста.

Постановка восьми (8) повторов каждого образца панели проводилась с использованием каждого из 3 лотов набора для теста **cobas** BRAF (n = 24/образец панели). Табл. 19 демонстрирует чувствительность каждой смеси FFPEТ, определенную по наименьшему количеству ДНК, обеспечивающему частоту результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для мутации V600E гена BRAF не менее 95 % (затемненные строки).

Табл. 19
Чувствительность теста cobas BRAF при использовании смесей FFPEТ

Смесь FFPEТ	Процент мутации методом 454-секвенирования	Количество ДНК в образцах панели	Частота результата «Mutation Detected» (n = 24)
10%-ная смесь FFPEТ	10 %	125 нг/25 мкл	100 %
		41,7 нг/25 мкл	100 %
		13,9 нг/25 мкл	100 %
		4,6 нг/25 мкл	100 %
		1,5 нг/25 мкл	100 %
		0,5 нг/25 мкл	92 %
		0,2 нг/25 мкл	83 %
		0,1 нг/25 мкл	29 %
5%-ная смесь FFPEТ	5 %	125 нг/25 мкл	96 %
		41,7 нг/25 мкл	100 %
		13,9 нг/25 мкл	100 %
		4,6 нг/25 мкл	100 %
		1,5 нг/25 мкл	83 %
		0,5 нг/25 мкл	54 %
		0,2 нг/25 мкл	67 %
		0,1 нг/25 мкл	25 %
2,5%-ная смесь FFPEТ	2 %	125 нг/25 мкл	0 %
		41,7 нг/25 мкл	0 %
		13,9 нг/25 мкл	4 %
		4,6 нг/25 мкл	21 %
		1,5 нг/25 мкл	21 %
		0,5 нг/25 мкл	33 %
		0,2 нг/25 мкл	13 %
		0,1 нг/25 мкл	8 %
0 % (дикий тип)	—	125 нг/25 мкл	0 %

Это исследование показывает, что тест **cobas** BRAF может обнаруживать мутацию V600E гена BRAF при уровне мутации $\geq 5\%$ при стандартном количестве внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста обнаруживать мутацию при меньших количествах внесенной ДНК показывает, что если образцы будут содержать ДНК, разрушенную после фиксации, мутация все равно будет обнаружена. Все результаты теста образца дикого типа гена BRAF были «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена).

Аналитическая чувствительность, определенная с использованием образцов FFPET

Чтобы подтвердить заявленную способность к обнаружению мутации при уровне 5 % в образцах пациентов, двадцать четыре отдельных среза толщиной 5 мкм из двух образцов FFPET с мутацией V600E гена BRAF, содержащих 6 % и 11 % мутантных последовательностей, обрабатывали индивидуально с использованием 3 лотов набора для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit с целью выделения ДНК. Из каждого среза готовили серию разведений ДНК, чтобы получить комплект из 8 образцов, как описано в Табл. 20.

Табл. 20
Подготовка образцов панели разведения из образцов FFPET

	Средний процент мутации V600E *	Количество ДНК в образцах панели разведения (нг/25 мкл)
Образец 1	6 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1
Образец 2	11 %	125; 41,7; 13,9; 4,6; 1,5; 0,5; 0,2; 0,1

* Средний процент мутации в образце, определенный 454-секвенированием.

Постановка восьми (8) повторов каждого образца панели проводилась с использованием каждого из 3 лотов набора для теста **cobas** BRAF (n = 24/образец панели). Чувствительность для каждого образца FFPET была определена по наименьшему количеству ДНК, обеспечивающему частоту результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для мутации V600E гена BRAF не менее 95 % (затемненные строки). Результаты исследования приведены в Табл. 21.

Табл. 21
Чувствительность теста cobas BRAF при использовании образцов FFPET

Образец FFPET	Процент мутации методом 454-секвенирования	Количество ДНК в образцах панели	Частота результата «Mutation Detected» (n = 48)
Образец 1	6 %	125 нг/25 мкл	100 %
		41,7 нг/25 мкл	100 %
		13,9 нг/25 мкл	100 %
		4,6 нг/25 мкл	83 %
		1,5 нг/25 мкл	71 %
		0,5 нг/25 мкл	29 %
		0,2 нг/25 мкл	17 %
		0,1 нг/25 мкл	0 %
Образец 2	11 %	125 нг/25 мкл	100 %
		41,7 нг/25 мкл	100 %
		13,9 нг/25 мкл	100 %
		4,6 нг/25 мкл	71 %
		1,5 нг/25 мкл	46 %
		0,5 нг/25 мкл	17 %
		0,2 нг/25 мкл	13 %
		0,1 нг/25 мкл	8 %

Это исследование показывает, что тест **cobas** BRAF может обнаруживать мутацию V600E гена BRAF в реальных клинических образцах FFPET при уровне мутации $\geq 5\%$ при стандартном количестве внесенной ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста обнаруживать мутацию при меньших количествах внесенной ДНК показывает, что если образцы будут содержать ДНК, разрушенную после фиксации, мутация все равно будет обнаружена.

Воспроизводимость

Исследование выполнялось для оценки воспроизводимости теста **cobas** BRAF между двумя лотами набора реагентов, двумя операторами и четырьмя днями тестирования на пяти образцах FFPET папиллярной карциномы щитовидной железы. Эти образцы FFPET содержали разный процент опухоли (50–70 %) и процент мутантных аллелей (16–22 %), в том числе два образца с мутацией V600E с ~16–18 % мутации (~3 × LoD). Правильный результат был получен для 100 % протестированных образцов (80/80). Среди протестированных образцов дикого типа не было ложноположительных. В итоге тест **cobas** BRAF показал высокую воспроизводимость на образцах с низким содержанием опухоли и низким процентным содержанием мутантных аллелей, между операторами, лотами набора реагентов и днями тестирования.

Корреляция с эталонным методом

Чтобы оценить показатели теста **cobas BRAF** при сравнении с 2× двунаправленным секвенированием по Сэнгеру, были собраны результаты секвенирования по Сэнгеру 159 образцов FFPET ПКЩЖ. Анализ первичной согласованности между результатами теста **cobas BRAF** и результатами секвенирования по Сэнгеру для детекции мутации V600E показан в Табл. 22 для одного из двух протестированных лотов набора реагента. Второй лот показал схожие результаты, за исключением одного образца, который дал результат «Mutation Not Detected» (Мутация не обнаружена). Разрешение противоречий методом 454-секвенирования определило, что образец содержал 1,4 % мутации, что ниже 5 % заявленной чувствительности для теста **cobas BRAF**.

Табл. 22
Общие показатели теста cobas BRAF в сравнении с секвенированием по Сэнгеру

Тест cobas BRAF (исследуемый метод)	Секвенирование по Сэнгеру (эталонный метод)		
	Мутация V600E гена BRAF обнаружена ^a	Мутация V600E гена BRAF не обнаружена ^b	Всего
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Всего	89	70	159
Процент согласованности положительных результатов (95 % ДИ)	100 % × 88/89 = 98,9 % (93,9 %, 99,8 %)		
Процент согласованности отрицательных результатов (95 % ДИ)	100 % × 57/70 = 81,4 % (70,8 %, 88,8 %)		
Общий процент согласованности (95 % ДИ)	100 % × 145/159 = 91,2 % (85,8 %, 94,7 %)		

^a Результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) указывает на присутствие преобладающего типа мутации гена BRAF, V600E (1799 T>A), согласно результатам секвенирования по Сэнгеру.

^b Результат Mutation Not Detected (Мутация не обнаружена) указывает на отсутствие преобладающего типа мутации гена BRAF, V600E, согласно результатам секвенирования по Сэнгеру (например, дикий тип, нет мутации или другие мутации).

Примечание. ДИ — (показатель) доверительный интервал.

Каждый из образцов, давший противоречивые результаты теста **cobas BRAF** и секвенирования по Сэнгеру, был подвергнут 454-секвенированию (количественному массово параллельному пиросеквенированию) как второму эталонному методу. Второй анализ согласованности после разрешения противоречий представлен в Табл. 23.

Один образец дал несогласующиеся результаты («Mutation Not Detected» [Мутация не обнаружена] при тесте **cobas BRAF** и «V600E» при секвенировании по Сэнгеру). 454-секвенирование показало результат дикого типа, согласующийся с результатом теста **cobas BRAF**.

Для двенадцати из тринадцати образцов с несогласующимися результатами, в которых тест **cobas BRAF** обнаружил мутацию, а секвенирование по Сэнгеру — дикий тип, 454-секвенирование выявило мутацию V600E (1,2–19 % аллельной частоты), согласующуюся с результатом теста **cobas BRAF**.

Оставшийся образец, имевший мутацию V600E, выявленную тестом **cobas BRAF**, был дикого типа в результате как секвенирования по Сэнгеру, так и 454-секвенирования. Дополнительное 454-секвенирование, выполненное позднее, подтвердило низкое процентное содержание мутации V600E в образце.

Табл. 23
**Результаты теста cobas BRAF и секвенирования по Сэнгеру
после разрешения противоречий методом 454-секвенирования**

Тест cobas BRAF (исследуемый метод)	Секвенирование по Сэнгеру после разрешения противоречий методом 454-секвенирования		
	Мутация V600E гена BRAF обнаружена	Мутация V600E гена BRAF не обнаружена	Всего
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Всего	101	58	159
Процент согласованности положительных результатов (95 % ДИ)	100 % × 101 ÷ 101 = 100,0 % (96,3 %, 100,0 %)		
Процент согласованности отрицательных результатов (95 % ДИ)	100 % × 57 ÷ 58 = 98,3 % (90,9 %, 99,7 %)		
Общий процент согласованности (95 % ДИ)	100 % × 158 ÷ 159 = 99,4 % (96,5 %, 99,9 %)		

СПИСОК СИГНАЛЬНЫХ СООБЩЕНИЙ ДЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сигнальные сообщения для результатов можно найти на вкладке «Результаты». Источник сигнального сообщения указан в кодах сигнальных сообщений, приведенных в Табл. 24. В Табл. 25 перечислены все сигнальные сообщения для результатов, имеющие значение для пользователя.

Табл. 24
Источник сигнального сообщения

Код сигнального сообщения начинается с	Источник сигнального сообщения	Пример
M *	Множественная или иная причина	M6
R	Интерпретация результата	R200
Z *	Анализатор	Z1

* Подробные сведения приведены в руководстве пользователя системы **cobas**[®] 4800 для теста **cobas**[®] 4800.

Табл. 25
Список сигнальных сообщений для результатов

Код сигнального сообщения	Критичность	Описание	Рекомендуемое действие
R200	Ошибка	Мутантный контроль невалиден.	<p>Повторите анализ. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на одно из следующего:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Наблюдаемое значение изгиба для мутантного контроля было ниже установленного порогового значения (например, изгиб слишком низкий). Это могло произойти из-за контаминации ДНК или ошибки алгоритма из-за атипичной картины флуоресценции.2. Наблюдаемое значение изгиба для мутантного контроля было выше установленного порогового значения (например, изгиб слишком высокий). Это возможно в случаях 1) неправильной подготовки рабочего мастермикса, 2) ошибки раскапывания при внесении мастермикса в реакционную лунку микропланшета или 3) ошибки раскапывания при внесении мутантного контроля в реакционную лунку микропланшета.
R201	Ошибка	Контроль дикого типа невалиден.	<p>Повторите анализ. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на одно из следующего:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Наблюдаемое значение изгиба для контроля дикого типа было ниже установленного порогового значения (например, изгиб слишком низкий). Это могло произойти из-за контаминации ДНК или ошибки алгоритма из-за атипичной картины флуоресценции.2. Наблюдаемое значение изгиба для контроля дикого типа было выше установленного порогового значения (например, изгиб слишком высокий). Это возможно в случаях 1) неправильной подготовки рабочего мастермикса, 2) ошибки раскапывания при внесении мастермикса в реакционную лунку микропланшета или 3) ошибки раскапывания при внесении дикого типа контроля в реакционную лунку микропланшета.

Код сигнального сообщения	Критичность	Описание	Рекомендуемое действие
R202	Ошибка	Мутантный Ct не обнаружен.	<p>Повторите образец. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на то, что значение изгиба, характерного для мутации, в образце не определено. Это может указывать на отсутствие мутации в образце либо на одну или несколько из следующих причин:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Низкое процентное содержание мутантных последовательностей, которое ниже предела обнаружения теста. 2. Низкое качество геномной ДНК в образце. 3. Неправильная обработка образца. 4. Присутствие в образце ингибиторов ПЦР. 5. Редкие мутации в участках геномной ДНК, перекрываемых праймерами и (или) зондом для мутантного типа. 6. Ошибка раскапывания образца, или образец ДНК не был внесен в реакционную лунку.
R203	Ошибка	Ct для дикого типа не обнаружен.	<p>Повторите образец. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на то, что значение изгиба, характерного для дикого типа, в образце не определено. Отсутствие изгиба дикого типа указывает на одну или несколько из следующих причин:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Низкое качество геномной ДНК в образце. 2. Неправильная обработка образца. 3. Присутствие в образце ингибитора ПЦР. 4. Редкие мутации в участках геномной ДНК, перекрываемых праймерами и (или) зондом для дикого типа. 5. Образец ДНК не был добавлен в одну или несколько лунок.

Код сигнального сообщения	Критичность	Описание	Рекомендуемое действие
R204	Ошибка	Мутантный Ct вне диапазона.	<p>Повторите образец. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на одно из следующего:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Наблюдаемое значение изгиба, характерного для мутации, в образце было ниже установленного порогового значения (например, изгиб слишком низкий). Такое возможно, если смесь для ПЦР значительно переполнена концентрированной геномной ДНК, или вследствие ошибки алгоритма из-за атипичной картины флуоресценции. 2. Наблюдаемое значение изгиба, характерного для мутации, в образце было выше установленного порогового значения (например, изгиб слишком высокий). Это может указывать на одну или несколько из следующих причин: <ul style="list-style-type: none"> • Низкое процентное содержание мутантных последовательностей, которое ниже предела обнаружения теста. • Ошибка раскапывания при внесении образца ДНК в реакционную лунку. • Низкое качество геномной ДНК в образце. • Неправильная обработка образца. • Присутствие в образце ингибиторов ПЦР. • Редкие мутации в участках геномной ДНК, перекрываемых праймерами и (или) зондом для мутантного типа.
R205	Ошибка	Ct дикого типа вне диапазона.	<p>Повторите образец. См. вкладыш в упаковке конкретного теста.</p> <p>Этот код сигнального сообщения указывает на одно из следующего:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Наблюдаемое значение изгиба, характерного для дикого изгиба, в образце было ниже установленного порогового значения (например, изгиб слишком низкий). Такое возможно, если смесь для ПЦР значительно переполнена концентрированной геномной ДНК, или вследствие ошибки алгоритма из-за атипичной картины флуоресценции. 2. Наблюдаемое значение изгиба, характерного для дикого типа, в образце было выше установленного порогового значения (например, изгиб слишком высокий). Это может указывать на одну или несколько из следующих причин: <ul style="list-style-type: none"> • Ошибка раскапывания при внесении образца ДНК в реакционную лунку. • Низкое качество геномной ДНК в образце. • Неправильная обработка образца. • Присутствие в образце ингибиторов ПЦР. • Редкие мутации в участках геномной ДНК, перекрываемых праймерами и (или) зондом для дикого типа.

ЛИТЕРАТУРА

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

Сведения о редакции документа	
Doc Rev. 10.0 08/2019	<p>Обновлены разделы «НАЗНАЧЕНИЕ» и «КРАТКИЙ ОБЗОР И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ТЕСТА».</p> <p>Добавлены разделы «Клиническая эффективность ZELBORAF® (вемурафениб)» и «Клиническая эффективность COTELLIC® (кобиметиниб)».</p> <p>В раздел «СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ» добавлена информация о стабильности микропрепаратов.</p> <p>В раздел «ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ» добавлена информация о меланине.</p> <p>Добавлены общие языковые правки, для упрощения и согласования с инструкцией по эксплуатации теста для диагностики <i>in vitro</i> cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (США IVD).</p> <p>В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.</p>
11/2019	<p>Исправлен знак «больше чем или равно» на стр. 24 на правильное изображение в формате PDF.</p> <p>Обновлена страница символов.</p> <p>В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.</p>
Doc Rev. 11.0 06/2020	<p>Удалена следующая информация о наборе для пробоподготовки ДНК:</p> <ul style="list-style-type: none"> • списки реагентов и информация о составе; • соответствующие этапы процедуры и примечания. <p>Добавлены ссылки на инструкцию по эксплуатации набора для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit в начале и в разделе «Ограничения процедуры».</p> <p>На всем протяжении документа «руководство по системе и руководство оператора» заменены на «руководство пользователя системы cobas® 4800 или поддержка пользователя системы cobas® 4800».</p> <p>Во всем документе исправлены опечатки, текст приведен к единообразию и согласованности с инструкцией по эксплуатации для США.</p> <p>Добавлен «Список сигнальных сообщений для результатов».</p> <p>Обновлена ссылка на International Air Transport Association в списке литературы.</p> <p>Обновлены страница гармонизированных символов, раздел «Товарные знаки и патенты» и адреса распространителей.</p> <p>Добавлена формулировка для пояснения того, что маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS.</p> <p>В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.</p>

Произведено в США



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

Товарные знаки и патенты

COBAS, COBAS Z и AMPERASE являются товарными знаками компании Roche.

Все остальные торговые наименования и товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

Технология защиты от перекрестной контаминации в составе фермента AmpErase охраняется патентом США 7,687,247, который принадлежит компании Life Technologies и передан компании Roche Molecular Systems, Inc на основании лицензии.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.
























06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-01



Приведенные ниже символы применяются для маркировки продукции для ПЦР-диагностики компании Roche.

	Вспомогательное программное обеспечение		Номер постановки
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе		Биологическая опасность
	Список штрихкодов		Номер по каталогу
	Обратитесь к инструкции		Только для испытаний IVD
	Рассчитано на <n> тестов		Нижний предел заданного диапазона
	Состав набора		Производитель
	Распространитель		Хранить в темноте
	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон
	Файл с описанием теста		Использовать до
	Верхний предел заданного диапазона		Только для США. Федеральное законодательство ограничивает право продажи данного устройства терапевтом или по его рецепту.
	Глобальный номер товара		Дата производства
	СЕ маркировка соответствия требованиям ЕС — это изделие соответствует применимым требованиям для выдачи сертификата в ЕС на медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> .		

Телефон службы технической поддержки в США: 1-800-526-1247