

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test

cobas[®]

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Fare riferimento al **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) per informazioni sulla preparazione dei campioni.

USO PREVISTO

Il test **cobas[®]** 4800 per la mutazione BRAF V600 è destinato principalmente alla rilevazione delle mutazioni BRAF V600 nel DNA estratto da tessuti umani di melanoma e carcinoma tiroidale papillare (PTC) fissati in formalina e inclusi in paraffina. Nel melanoma, il test è destinato all'uso come strumento per la selezione dei pazienti i cui tumori presentano le mutazioni BRAF V600 che sono idonei alle terapie con ZELBORAF[®] (vemurafenib) da solo o con COTELLIC[®] (cobimetinib) in associazione con ZELBORAF[®] (vemurafenib).

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Le mutazioni attivanti del proto-oncogene BRAF sono presenti in molti tumori umani, tra cui il melanoma maligno, il carcinoma del colon-retto, il carcinoma ovarico e il carcinoma tiroideo.^{1, 2} Le mutazioni BRAF sono state identificate nel 40-60% dei melanomi maligni³ e nel 36-46% dei carcinomi tiroidei papillari.^{4, 5} Poiché le mutazioni BRAF sono comuni anche nei nevi benigni,⁶ si suppone che siano un evento molto precoce. La scoperta di queste mutazioni somatiche del gene BRAF nel melanoma, nel carcinoma tiroidale papillare e in altri tumori umani ha contribuito a spiegare il ruolo centrale della BRAF chinasi nel segnalare i percorsi che controllano la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare. Nelle cellule normali, il gene BRAF fa parte di un percorso del segnale altamente regolato che media gli effetti dei recettori del fattore di crescita (ad esempio, EGFR) tramite le proteine RAS, RAF, MEK ed ERK. Le mutazioni oncogeniche del gene BRAF determinano un aumento della funzionalità di chinasi, con la conseguente attivazione costitutiva del percorso RAF-MEK-ERK in assenza dei tipici fattori di crescita.

La maggior parte delle mutazioni del gene BRAF nel melanoma e in altri tumori umani interessano il codone 600.⁷ La mutazione predominante nel codone 600 è la mutazione V600E (GTG > GAG). Con minore frequenza sono state osservate anche mutazioni dei dinucleotidi che interessano il codone 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) e V600D (GTG > GAT)] principalmente nel melanoma e con minore frequenza in altri tumori, ad esempio nel carcinoma del colon-retto.

Il test **cobas[®]** 4800 per la mutazione BRAF V600 è un test basato sulla PCR real-time e formulato in modo specifico per rilevare la presenza della mutazione V600E (T1799A). Il test **cobas[®]** 4800 per la mutazione BRAF V600 è utilizzato come strumento diagnostico di supporto per la terapia con vemurafenib, un composto che inibisce la versione mutante V600E del BRAF. Studi clinici sul vemurafenib nei casi di melanoma in stadio avanzato hanno dimostrato che i pazienti oncologici nei quali è presente la mutazione V600E possono trarre beneficio clinico dal composto.^{8, 9} Un successivo studio clinico correlato, relativo all'uso del cobimetinib in associazione con il vemurafenib nei casi di melanoma in stadio avanzato, ha dimostrato che i pazienti oncologici con una mutazione V600E o V600K, rilevata dal test **cobas[®]** 4800 per la mutazione BRAF V600, possono trarre beneficio clinico da questa terapia.^{10, 11} La mutazione V600K è presente in circa il 10-15% dei campioni di melanoma con mutazioni BRAF V600.¹²

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test **cobas[®]** 4800 per la mutazione BRAF V600 (**cobas** BRAF Test) si basa su due procedure: (1) preparazione manuale dei campioni per estrarre il DNA genomico dal tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPET); e (2) amplificazione PCR e rilevazione del DNA target tramite una coppia di primer complementari e due sonde oligonucleotidiche marcate con fluorocromi diversi. Una sonda rileva in modo specifico la sequenza BRAF V600 wild-type e l'altra sonda rileva la sequenza della mutazione V600E. Sono inclusi due controlli esterni. L'allele wild-type svolge la funzione di controllo interno dell'intera procedura.

Preparazione dei campioni

Per il trattamento dei campioni di tessuto FFPET e l'estrazione del DNA genomico viene utilizzato il kit di preparazione dei campioni **cobas[®]** DNA, con una procedura manuale basata sulla capacità di legame tra gli acidi nucleici e le fibre di vetro. Una sezione deparaffinata di un campione FFPET, dello spessore di 5 µm, viene sottoposta a lisi mediante incubazione a una temperatura elevata con una proteasi e un tampone di lisi/legame caotropico che rilascia gli acidi nucleici e protegge dalle DNasi il DNA genomico rilasciato. La miscela di lisi viene quindi addizionata di isopropanolo e centrifugata attraverso una colonnina con un inserto a filtro in fibra di vetro. Durante la centrifugazione, il DNA genomico si lega alla superficie del filtro in fibra di vetro. Le sostanze che non formano legami, ad esempio i sali, le proteine e altre impurità cellulari, vengono rimosse mediante centrifugazione. Gli acidi nucleici adsorbiti vengono lavati e quindi eluiti con una soluzione acquosa. La quantità di DNA genomico viene determinata tramite spettrofotometro e corretta fino a una concentrazione fissa da aggiungere alla miscela di amplificazione e rilevazione. Il DNA target viene quindi sottoposto ad amplificazione e rilevazione sul **cobas z** 480 analyzer con i reagenti di amplificazione e rilevazione inclusi nel kit del test **cobas** BRAF.

Amplificazione e rilevazione tramite PCR

Selezione del target

I primer utilizzati dal test **cobas** BRAF definiscono una sequenza di 116 coppie di basi (base pair, bp) di DNA genomico umano contenente il sito del codone 600 nell'esone 15 del gene BRAF. Non viene amplificato l'intero gene BRAF. Il test **cobas** BRAF rileva in modo specifico la variazione T>A nel nucleotide 1799 del gene BRAF, che determina la sostituzione della valina con l'acido glutammico nel codone 600 (V600E). Le sonde TaqMan marcate con fluorocromi specifici per il gene BRAF wild-type e per il target del DNA mutante si legano rispettivamente alle sequenze wild-type e mutante. Le sequenze wild-type e mutante vengono rilevate utilizzando un canale ottico dedicato per ogni sequenza.

Amplificazione del target

Per l'amplificazione del target viene utilizzata la DNA Polimerasi Thermus Species Z05. Inizialmente la miscela della reazione PCR viene riscaldata per consentire la denaturazione del DNA genomico e l'esposizione delle sequenze target dei primer. A mano a mano che la miscela si raffredda, i primer upstream e downstream (a monte e a valle) si appaiano alle sequenze di DNA target. In presenza di ioni di metallo divalenti e di dNTP in eccesso, la DNA Polimerasi Z05 estende ogni primer appaiato e sintetizza così un secondo filamento di DNA. Il primo ciclo di PCR termina quindi con la produzione di una copia di DNA a doppio filamento della regione target di 116 bp del gene BRAF. Questo processo viene ripetuto per un certo numero di cicli e, ad ogni ciclo, la quantità di DNA amplicone raddoppia. L'amplificazione interessa soltanto la regione del gene BRAF che è compresa tra i primer.

Rilevazione real-time automatizzata

Il test **cobas** BRAF utilizza la tecnologia Real-time PCR. Nella reazione, ogni sonda oligonucleotidica target-specifica è marcata con un fluorocromo rivelatore (reporter) e con un fluorocromo soppressore (quencher), ovvero una molecola in grado di assorbire (sopprimere) le emissioni fluorescenti del reporter in una sonda intatta. Ad ogni ciclo di amplificazione, la sonda complementare alla sequenza di DNA a filamento singolo nell'amplicone si lega e viene successivamente segmentata dall'attività di 5'-3' nucleasi della DNA polimerasi Z05. Dopo che il fluorocromo reporter viene separato dal fluorocromo quencher da questa attività di nucleasi, la fluorescenza di una lunghezza d'onda caratteristica può essere misurata quando il fluorocromo reporter viene eccitato da uno spettro di luce appropriato. Vengono utilizzati due diversi fluorocromi reporter per marcare la sonda specifica del target BRAF wild-type (WT) e la sonda della mutazione BRAF V600E. L'amplificazione delle due sequenze BRAF può essere rilevata in modo indipendente in un singolo pozzetto di reazione attraverso la misurazione della fluorescenza alle due lunghezze d'onda caratteristiche nei canali ottici dedicati.

Amplificazione selettiva

Il test **cobas** BRAF consegue l'amplificazione selettiva degli acidi nucleici target estratti dal campione utilizzando l'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) e il trifosfato di deossiuridina (dUTP).¹³ L'enzima AmpErase riconosce e catalizza la distruzione dei filamenti di DNA contenenti desossiuridina, ma non del DNA contenente timidina. La deossiuridina non è presente nel DNA naturale, ma è sempre presente nell'amplicone perché il dUTP impiegato è uno dei trifosfati di deossiuridina usati nel reagente Master Mix, pertanto solo l'amplicone contiene deossiuridina. La deossiuridina fa sì che l'amplicone contaminante sia suscettibile alla distruzione da parte dell'enzima AmpErase prima dell'amplificazione del DNA target. L'enzima AmpErase, che è incluso nel reagente della miscela di reazione, catalizza la segmentazione del DNA contenente deossiuridina nei residui di deossiuridina, aprendo la catena di deossiribosi nella posizione C1. Durante il riscaldamento nella prima fase del ciclo termico a pH alcalino, la catena del DNA amplicone si spezza in corrispondenza della posizione della deossiuridina, rendendo così non amplificabile il DNA. L'enzima AmpErase è inattivo a temperature superiori ai 55°C (in pratica, durante tutte le fasi del ciclo termico), pertanto non distrugge l'amplicone target.

REAGENTI

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 test (M/N: 05985595190)			
Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento^a
RXNMIX (Miscela di reazione)	Tampone tricina Acetato di potassio Idrossido di potassio Glicerolo Tween 20 EDTA 5% dimetilsolfossido < 0,09% dNTP < 0,10% DNA polimerasi Z05 (batterica) < 0,10% Enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico) < 0,003% Aptamero oligonucleotidico 0,08% Sodio azide	3 × 0,16 ml	N/D
MGAC (Acetato di magnesio)	Acetato di magnesio 0,09% Sodio azide	3 × 0,15 ml	N/D
BRAF OM (Miscela di oligo BRAF)	Tampone Tris-HCl EDTA 0,09% Sodio azide Poly rA RNA (sintetico) < 0,01% Primer BRAF a monte e a valle < 0,01% Sonde fluorescenti BRAF	3 × 0,13 ml	N/D
BRAF MUT (Controllo BRAF mutante)	Tampone Tris-HCl EDTA Poly rA RNA (sintetico) 0,05% Sodio azide < 0,001% DNA plasmidico (batterico) contenente la sequenza BRAF mutante < 0,001% DNA plasmidico (batterico) contenente la sequenza BRAF wild-type	2 × 0,13 ml	N/D
BRAF WT (Controllo BRAF wild-type)	Tampone Tris-HCl EDTA Poly rA RNA (sintetico) 0,05% Sodio azide < 0,001% DNA plasmidico (batterico) contenente la sequenza BRAF wild-type	2 × 0,13 ml	N/D
DNA SD (Diluyente del campione di DNA)	Tampone Tris-HCl 0,09% Sodio azide	2 × 1 ml	N/D

^a L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

A. PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

- B. Questo test è destinato all'uso con campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina.
- C. Non pipettare con la bocca.
- D. Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio.
- E. Evitare la contaminazione dei reagenti con batteri e DNA.
- F. Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto nel rispetto delle leggi vigenti.
- G. Non utilizzare i kit dopo le date di scadenza.
- H. Non mescolare reagenti appartenenti a kit o a lotti diversi.
- I. Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) sono disponibili su richiesta presso l'ufficio Roche locale.
- J. Per evitare contaminazioni è necessario indossare i guanti e sostituirli sempre dopo avere manipolato i campioni e prima di utilizzare i reagenti **cobas**[®] 4800.
- K. Per evitare che la soluzione di lavoro Master Mix venga contaminata dai campioni di DNA, la procedura di amplificazione e rilevazione deve essere svolta in un'area diversa dall'area in cui viene estratto il DNA. È necessario pulire accuratamente l'area di lavoro di amplificazione e rilevazione prima di procedere alla preparazione della soluzione di lavoro Master Mix. Per una pulizia adeguata di tutte le superfici, inclusi rack e pipettatori, utilizzare prima una soluzione di ipoclorito di sodio* allo 0,5% e quindi una soluzione di etanolo al 70%.
*** NOTA: la candeggina liquida per uso domestico reperibile in commercio contiene in genere ipoclorito di sodio a una concentrazione del 5,25%. La diluizione 1:10 della candeggina per uso domestico consente di ottenere una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%.**
- L. I campioni devono essere manipolati come se fossero infettivi, adottando le procedure di sicurezza del laboratorio delineate nella pubblicazione *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ e nel documento CLSI M29-A4.¹⁵
- M. I reagenti **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** e **DNA SD** contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame formando azoturi metallici altamente esplosivi. Quando le soluzioni contenenti sodio azide vengono smaltite nei lavelli del laboratorio, è necessario sciacquare gli scarichi con abbondante acqua fredda per impedire l'accumulo di azoturi.
- N. Indossare occhiali protettivi, camici da laboratorio e guanti da laboratorio durante la manipolazione dei reagenti. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita del reagente, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- O. Tutti i consumabili sono monouso. Non riutilizzare.
- P. Non utilizzare i consumabili dopo la data di scadenza.
- Q. Non utilizzare la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) per la pulizia del **cobas z** 480 analyzer. Pulire il **cobas z** 480 analyzer attenendosi alle procedure descritte nel Manuale Operativo del **cobas**[®] 4800 System o nell'Assistenza Utente del **cobas**[®] 4800 System.
- R. Per ulteriori avvertimenti, precauzioni e procedure volte a ridurre il rischio di contaminazione per il **cobas z** 480 analyzer, fare riferimento al Manuale Operativo del **cobas**[®] 4800 System o all'Assistenza Utente del **cobas**[®] 4800 System.
- S. È consigliato l'uso di pipette sterili monouso e di puntali per pipette privi di DNasi.

REQUISITI PER LA MANIPOLAZIONE E LA CONSERVAZIONE

- A. Non congelare i reagenti.
- B. Conservare a 2-8°C i reagenti **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF OM**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** e **DNA SD**. Dopo l'apertura, questi reagenti sono stabili per un massimo di 4 utilizzi nell'arco di 60 giorni o fino alla data di scadenza, se precedente.
- C. Proteggere dall'esposizione prolungata alla luce il reagente **BRAF OM** e la soluzione di lavoro Master Mix (preparata aggiungendo **BRAF OM** e **MGAC** a **RXNMIX**).
- D. La soluzione di lavoro Master Mix (preparata aggiungendo **BRAF OM** e **MGAC** a **RXNMIX**) deve essere conservata a 2-8°C al buio. I controlli e i campioni preparati devono essere aggiunti entro 1 ora dalla preparazione della soluzione di lavoro Master Mix.
- E. i campioni trattati (DNA estratto) sono stabili al massimo per 24 ore tra 15°C e 30°C, o al massimo per 14 giorni tra 2°C e 8°C, o al massimo per 60 giorni tra -15°C e -25°C o dopo 3 cicli di congelamento/scongelo, se conservati tra -15°C e -25°C. Il DNA estratto deve essere sottoposto ad amplificazione entro i periodi di conservazione consigliati o prima della data di scadenza del kit di preparazione dei campioni **cobas**[®] DNA utilizzato per l'estrazione del DNA, se precedente.
- F. L'amplificazione deve essere avviata entro 1 ora dall'aggiunta dei campioni trattati e dei controlli alla soluzione di lavoro Master Mix (preparata aggiungendo **BRAF OM** e **MGAC** a **RXNMIX**).

MATERIALE FORNITO

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

BRAF

24 test

RXNMIX

(Miscela di reazione) (tappo con bottone panna)

MGAC

(Acetato di magnesio) (tappo con bottone giallo)

BRAF OM

(Miscela di oligo BRAF) (tappo nero con bottone bianco)

BRAF MUT

(Controllo BRAF mutante) (tappo con bottone rosso)

BRAF WT

(Controllo BRAF wild-type) (tappo con bottone blu)

DNA SD

(Diluente per campioni di DNA) (tappo con bottone viola)

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190)
- Piastra per PCR e pellicola adesiva per il sistema **cobas®** 4800 (Roche M/N: 05232724001)
- Pipettatori regolabili*: (da 10 µl, 20 µl, 200 µl e 1000 µl) con puntali privi di DNasi con barriera antiaerosol o a spostamento positivo
- Provette per microcentrifuga con tappo ermetico (da 1,5 ml, sterili, prive di RNasi/DNasi, grado PCR) (qualsiasi fornitore)
- Spettrofotometro per misurare la concentrazione di DNA**
- Miscelatore vortex**
- Rack per provette per microcentrifuga
- Guanti da laboratorio, senza talco
- Congelatore in grado di conservare tra -25°C e -15°C

* *La manutenzione dei pipettatori deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore; l'accuratezza dei pipettatori deve rientrare nel 3% del volume dichiarato. Se specificato, è necessario utilizzare puntali privi di DNasi con barriera antiaerosol o a spostamento positivo, in modo da prevenire il deterioramento e la contaminazione crociata dei campioni.*

** *La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.*

Strumentazione e software

- **cobas z** 480 analyzer
- Unità di controllo del sistema **cobas®** 4800 SR2 con immagine del sistema operativo Windows XP
- Software del sistema **cobas®** 4800 SR2 versione 2.0 o successiva
- Software BRAF Analysis Package, versione 1.0 o successiva
- Lettore di codice a barre (Roche M/N: 05339910001)
- Stampante HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA: Manipolare tutti i campioni come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

A. Prelievo dei campioni

I campioni FFPET sono stati validati per l'uso con il test **cobas** BRAF.

B. Trasporto dei campioni

I campioni FFPET possono essere trasportati ad una temperatura compresa tra 15 e 30°C. Il trasporto dei campioni FFPET deve avvenire nel rispetto delle leggi vigenti per il trasporto degli agenti eziologici.¹⁶

C. Conservazione dei campioni

È confermata la stabilità dei campioni FFPET conservati a 15-30°C fino a 12 mesi dopo la data del prelievo. Le sezioni FFPET da 5 µm montate sui vetrini possono essere conservate a 15-30°C per un massimo di 60 giorni.

ISTRUZIONI PER L'USO

NOTA: tutti i reagenti (ad eccezione di RXNMIX, MGAC e BRAF OM) devono raggiungere la temperatura ambiente prima dell'uso. I reagenti RXN MIX, MGAC e BRAF OM possono essere utilizzati direttamente a 2-8°C per la preparazione della soluzione di lavoro Master Mix.

NOTA: eseguire il test cobas BRAF utilizzando solo sezioni FFPET di melanoma e carcinoma tiroidale papillare con uno spessore di 5 µm, contenenti almeno il 50% di cellule tumorali. Dopo la deparaffinazione, eseguire la macrodissezione di eventuali campioni contenenti meno del 50% di cellule tumorali.

NOTA: per istruzioni operative dettagliate sul cobas z 480 analyzer, fare riferimento al Manuale Operativo del cobas® 4800 System o all'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

Dimensioni della seduta

Il kit del test cobas BRAF consente di analizzare un numero minimo di 3 campioni più i controlli e un numero massimo di 24 campioni più i controlli. Sebbene sia possibile analizzare meno di 3 campioni più i controlli alla volta, così facendo potrebbe rimanere un volume di reagenti del kit insufficiente per una seduta di 24 campioni più i controlli. Il test cobas BRAF contiene i reagenti necessari per completare 8 sedute costituite da 3 campioni più i controlli. Per ogni seduta di analisi occorrono: un controllo mutante (cobas BRAF Test Mutant Control [BRAFMUT]) e un controllo wild-type (cobas BRAF Test Wild-Type Control [BRAFWT]). Vedere la sezione "Controllo di qualità".

Flusso di lavoro

NOTA: il test cobas BRAF consente di analizzare un massimo di 24 campioni in una seduta.

NOTA: per ottimizzare l'uso dei reagenti, ogni seduta di analisi dovrebbe includere almeno tre (3) campioni dei pazienti più i controlli.

Estrazione del DNA

Per estrarre il DNA dai campioni FFPET, utilizzare il cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N: 05985536190).

Macrodissezione

Se il contenuto tumorale del campione è inferiore al 50% dell'area, eseguire una macrodissezione nell'ambito della procedura di preparazione del campione.

Quantificazione del DNA

NOTA: la concentrazione del DNA deve essere misurata subito dopo la procedura di estrazione del DNA e prima della conservazione.

- A. Miscelare ogni stock di DNA agitando in vortex per 5 secondi prima della quantificazione.
- B. Quantificare il DNA con uno spettrofotometro attenendosi al protocollo del produttore. Utilizzare il reagente DNA EB contenuto nel cobas® DNA Sample Preparation Kit come bianco per lo strumento. Servono in media 2 letture concordanti. La differenza tra le due misurazioni non dovrebbe superare $\pm 10\%$ quando le letture della concentrazione del DNA sono $\geq 20,0$ ng/µl. Se le letture della concentrazione del DNA sono $< 20,0$ ng/µl, la differenza tra le due misurazioni non dovrebbe superare $\pm 2,0$ ng/µl.
- C. Per poter eseguire il test cobas BRAF, la concentrazione dello stock di DNA deve essere ≥ 5 ng/µl.

NOTA: per poter eseguire il test cobas BRAF, la concentrazione minima di ogni stock di DNA deve essere di 5 ng/µl. Se la concentrazione dello stock di DNA è < 5 ng/µl, per il campione in questione è necessario ripetere le procedure di deparaffinazione, estrazione e quantificazione del DNA utilizzando due sezioni FFPET di 5 µm. Per i campioni montati sui vetrini, dopo la deparaffinazione è necessario unire il tessuto di entrambe le sezioni in un'unica provetta, immergere il tessuto nel reagente TLB e PK contenuto nel cobas® DNA Sample Preparation Kit, quindi eseguire l'estrazione e la quantificazione del DNA. Per i campioni non montati sui vetrini, unire il tessuto delle due sezioni in un'unica provetta ed eseguire la deparaffinazione, l'estrazione e la quantificazione del DNA. Se lo stock di DNA è ancora < 5 ng/µl, rivolgersi al laboratorio clinico dal quale proviene il campione per richiedere un'altra sezione FFPET.

NOTA: i campioni trattati (DNA estratto) sono stabili al massimo per 24 ore tra 15°C e 30°C, o al massimo per 14 giorni tra 2°C e 8°C, o al massimo per 60 giorni tra -15°C e -25°C o dopo 3 cicli di congelamento/scongelo, se conservati tra -15°C e -25°C. Il DNA estratto deve essere sottoposto ad amplificazione entro i periodi di conservazione consigliati o prima della data di scadenza del kit di preparazione dei campioni cobas® DNA utilizzato per l'estrazione del DNA, se precedente.

AMPLIFICAZIONE E RILEVAZIONE

NOTA: per evitare che la soluzione di lavoro Master Mix venga contaminata dai campioni di DNA, la procedura di amplificazione e rilevazione deve essere svolta in un'area diversa dall'area in cui viene estratto il DNA. È necessario pulire accuratamente l'area di lavoro di amplificazione e rilevazione prima di procedere alla preparazione della soluzione di lavoro Master Mix. Per una pulizia adeguata di tutte le superfici, inclusi rack e pipettatori, utilizzare prima una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e quindi una soluzione di etanolo al 70%. la candeggina liquida per uso domestico reperibile in commercio contiene in genere ipoclorito di sodio a una concentrazione del 5,25%. La diluizione 1:10 della candeggina per uso domestico consente di ottenere una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%.

Configurazione dello strumento

fare riferimento al Manuale Operativo del **cobas**[®] 4800 System oppure all'Assistenza Utente del **cobas**[®] 4800 System per istruzioni dettagliate sulla configurazione del **cobas z** 480.

Configurazione degli ordini dei test

Fare riferimento al Manuale Operativo del **cobas**[®] 4800 System oppure all'Assistenza Utente del **cobas**[®] 4800 System per istruzioni dettagliate sui singoli passaggi del flusso di lavoro del test **cobas** BRAF.

Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione:

per ogni campione viene eseguita una sola amplificazione/rilevazione, utilizzando 25 µl di una diluizione di 5 ng/µl dello stock di DNA (125 ng in totale). Le istruzioni fornite di seguito descrivono come preparare almeno 35 µl di stock di DNA diluito a 5 ng/µl, a seconda della concentrazione iniziale dello stock di DNA. Ciò assicura che ogni campione utilizzi almeno 5 µl di stock di DNA, prevenendo la variazione che potrebbe verificarsi pipettando volumi più piccoli di campione.

Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione a concentrazioni tra 5 ng/µl e 35 ng/µl

NOTA: gli stock di DNA ottenuti dai campioni devono essere diluiti un attimo prima di avviare l'amplificazione e la rilevazione.

NOTA: per ogni campione viene eseguita una sola amplificazione/rilevazione, utilizzando 25 µl di una diluizione di 5 ng/µl dello stock di DNA (125 ng in totale).

- A. Per ogni campione, determinare la quantità di stock di DNA necessario applicando la seguente formula:
Volume dello stock di DNA richiesto = $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentrazione dello stock di DNA in ng}/\mu\text{l}$
- B. Per ogni campione, determinare la quantità di diluente **DNA SD** necessario applicando la seguente formula:
Volume di DNA SD richiesto in µl = $(35 \mu\text{l} - \text{volume dello stock di DNA richiesto in } \mu\text{l})$
- Esempio:
Concentrazione dello stock di DNA = 21 ng/µl
- A. Volume dello stock di DNA richiesto = $(35 \mu\text{l} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 21 \text{ ng}/\mu\text{l} = 8,3 \mu\text{l}$
- B. Volume di DNA SD richiesto in µl = $(35 \mu\text{l} - 8,3 \mu\text{l}) = 26,7 \mu\text{l}$

Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione a concentrazioni > 35 ng/µl

NOTA: gli stock di DNA ottenuti dai campioni devono essere diluiti un attimo prima di avviare l'amplificazione e la rilevazione.

NOTA: per ogni campione viene eseguita una sola amplificazione/rilevazione, utilizzando 25 µl di una diluizione di 5 ng/µl dello stock di DNA (125 ng in totale).

- A. Con concentrazioni dello stock di DNA > 35 ng/µl, utilizzare la formula seguente per calcolare la quantità di diluente del campione di DNA (**DNA SD**) necessaria per preparare almeno 35 µl di stock di DNA diluito. In questo modo si garantisce che in ogni campione vi siano almeno 5 µl di stock di DNA.
Vol. di DNA SD richiesto in µl = $[(5 \mu\text{l di stock di DNA} \times \text{conc. stock di DNA in ng}/\mu\text{l}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$
- B. Utilizzare il volume calcolato di **DNA SD** per diluire 5 µl di stock di DNA.
- Esempio:
Concentrazione dello stock di DNA = 42 ng/µl
- A. Vol. di DNA SD richiesto in µl = $[(5 \mu\text{l} \times 42 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 5 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 37 \mu\text{l}$
- B. Utilizzare il volume calcolato di **DNA SD** per diluire 5 µl di stock di DNA.

Diluizione dei campioni

- A. Nell'area riservata all'aggiunta dei campioni, preparare il numero appropriato di provette per microcentrifuga da 1,5 ml per le diluizioni degli stock di DNA, etichettandole con le informazioni di identificazione dei campioni.
- B. Utilizzando un pipettatore dotato di puntale per pipette con barriera antiaerosol, pipettare il volume di diluente **DNA SD** calcolato in ogni provetta campione etichettata in precedenza.
- C. Agitare in vortex ogni stock di DNA campione per 10 secondi.

- D. Utilizzando un pipettatore dotato di puntale per pipette con filtro antiaerosol, pipettare delicatamente il volume calcolato di ogni stock di DNA campione nella provetta di **DNA SD** opportunamente etichettata. Sostituire il puntale della pipetta per ogni nuovo campione.
- E. Tappare e miscelare ogni stock di DNA campione diluito in vortex per 10 secondi.
- F. Sostituire i guanti.

Preparazione della soluzione di lavoro Master Mix (MMX)

NOTA: l'oligo-miscela BRAF e l'MMX di lavoro sono fotosensibili. Dopo l'apertura, tutte le miscele BRAF OM e MMX di lavoro devono essere protette dall'esposizione prolungata alla luce.

- A. Calcolare il volume di **RXNMIX** necessario applicando la seguente formula:
 Volume di **RXNMIX** richiesto = (numero di campioni + 2 controlli + 1) × 10 µl
- B. Calcolare il volume di **BRAF OM** necessario applicando la seguente formula:
 Volume di **BRAF OM** richiesto = (numero di campioni + 2 controlli + 1) × 8 µl
- C. Calcolare il volume di **MGAC** necessario applicando la seguente formula:
 Volume di **MGAC** necessario = (numero di campioni + 2 controlli + 1) × 7 µl

È possibile utilizzare la Tabella 1 per determinare i volumi dei reagenti impiegati per la preparazione dell'MMX di lavoro, tenendo conto del numero di campioni inclusi nella seduta.

Tabella 1

		Volumi dei reagenti necessari per l'MMX di lavoro									
		N. di campioni*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µl	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µl	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Volume totale (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* N. di campioni + 2 controlli + 1

- D. Prelevare le fiale di **RXNMIX**, **BRAF OM** e **MGAC** dal luogo in cui sono conservate a 2-8°C. Agitare ogni reagente in vortex per 5 secondi, in modo che il liquido si raccolga sul fondo della provetta prima dell'uso. Etichettare una provetta per microcentrifuga sterile per la soluzione di lavoro Master Mix (MMX).
- E. Aggiungere il volume calcolato di **RXNMIX** nella provetta con l'etichetta MMX.
- F. Aggiungere il volume calcolato di **BRAF OM** nella provetta con l'etichetta MMX.
- G. Aggiungere il volume calcolato di **MGAC** nella provetta con l'etichetta MMX.
- H. Agitare la provetta in vortex per 5 secondi assicurando una miscelazione adeguata.

NOTA: utilizzare soltanto la piastra per PCR e la pellicola adesiva (Roche M/N: 05232724001) specifiche per il sistema cobas® 4800.

- I. Pipettare con cautela 25 µl di soluzione di lavoro MMX in ogni pozzetto di reazione della micropiastra che sarà utilizzato nella seduta. Evitare che il puntale della pipetta tocchi la piastra all'esterno del pozzetto.

Aggiunta di controlli e campioni

- A. Aggiungere 25 µl di controllo **BRAF MUT** nel pozzetto **A01** della micropiastra e miscelare con cura utilizzando il pipettatore per aspirare e dispensare nel pozzetto almeno due volte.
- B. Sostituire il puntale della pipetta, quindi aggiungere 25 µl di controllo **BRAF WT** nel pozzetto **B01** della micropiastra e miscelare con cura utilizzando il pipettatore per aspirare e dispensare nel pozzetto almeno due volte.

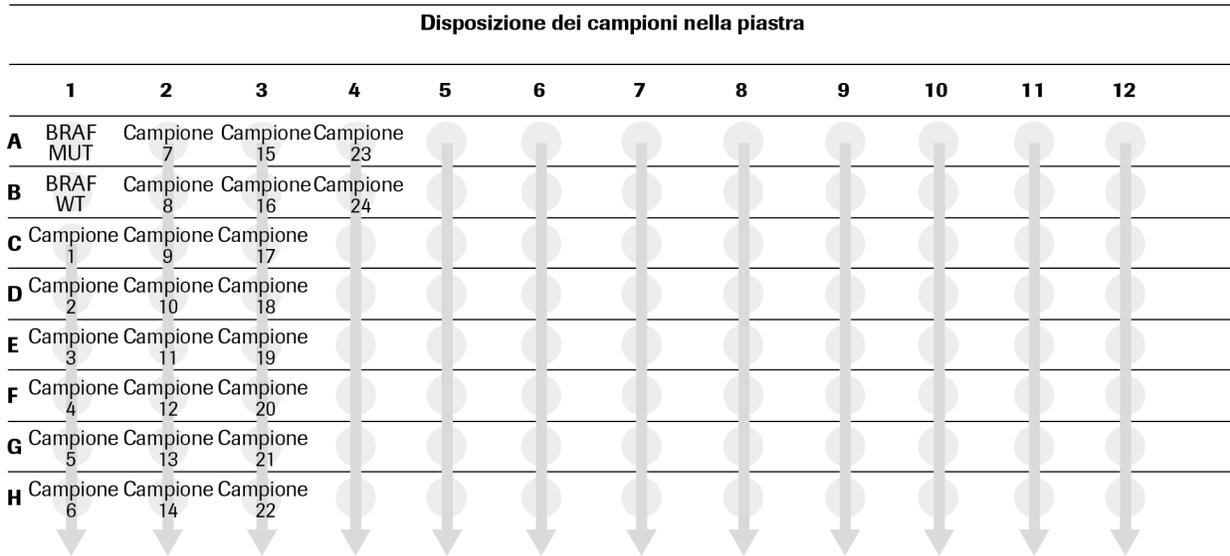
NOTA: in ogni seduta è necessario includere un controllo BRAF MUT nella posizione A01 e un controllo BRAF WT nella posizione B01, altrimenti l'analizzatore cobas z 480 considererà la seduta non valida.

NOTA: sostituire i guanti con la frequenza opportuna, in modo da prevenire sia la contaminazione tra campione e campione, sia la contaminazione esterna della provetta di reazione per PCR.

- C. Utilizzando un pipettatore dotato di puntale con barriera antiaerosol, aggiungere 25 µl di DNA campione diluito nel pozzetto appropriato contenente la soluzione di lavoro MMX, a partire dalla posizione **C01** della micropiastra (fare riferimento al modello nella Figura 1, sotto). Miscelare la miscela della reazione utilizzando il pipettatore per aspirare e dispensare nel pozzetto almeno due volte. Assicurarsi che tutto il liquido si raccolga sul fondo della provetta.

NOTA: è necessario aggiungere il DNA campione e i controlli alla micropiastra entro 1 ora dalla preparazione della soluzione di lavoro Master Mix (MMX).

Figura 1



- D. Continuare finché tutti i campioni da analizzare saranno stati aggiunti alla micropiastra.
- E. Coprire la micropiastra con la pellicola adesiva (in dotazione con le piastre). Utilizzare l'apposito applicatore per pellicola adesiva in modo che questa aderisca perfettamente alla superficie della micropiastra.
- F. Prima di avviare l'amplificazione e la rilevazione, verificare che tutto il liquido si sia raccolto sul fondo di ogni pozzetto.

NOTA: è necessario avviare l'amplificazione e la rilevazione entro 1 ora dall'aggiunta del DNA campione e dei controlli all'MMX di lavoro.

Avvio della PCR

Per istruzioni dettagliate sui singoli passaggi del flusso di lavoro BRAF, fare riferimento al Manuale Operativo del **cobas® 4800 System** o all'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.

Interpretazione dei risultati

NOTA: la validazione delle sedute e dei campioni viene eseguita tramite il software cobas® 4800 BRAF AP.

NOTA: una seduta valida può includere sia risultati validi che risultati non validi.

Se una seduta è valida, i risultati dei campioni possono essere interpretati con le modalità descritte nella Tabella 2.

Tabella 2
Interpretazione dei risultati dei campioni

Risultato del test cobas BRAF	Interpretazione
Mutation Detected	Rilevata una mutazione V600 nel sito del codone 600, nell'esone 15 del gene BRAF
Mutation Not Detected oppure No Mutation Detected*	Nessuna mutazione V600 rilevata nel sito del codone 600, nell'esone 15 del gene BRAF
Invalid	Il risultato non è valido. Ripetere il test sui campioni con risultati non validi (fare riferimento alle istruzioni contenute nella sezione Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi).
Failed	La seduta è fallita per un errore hardware o software

* Un risultato "Mutation Not Detected" o "No Mutation Detected" non esclude la presenza di una mutazione nel sito del codone 600 del gene BRAF, in quanto i risultati dipendono dal numero di copie di sequenze mutanti nel campione e possono essere influenzati dall'integrità del campione, dalla quantità di DNA estratto e dalla presenza di sostanze interferenti.

Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi

- A. Ripetere la diluizione dello stock di DNA campione non valido partendo dalle procedure **Calcolo della diluizione dello stock di DNA campione** e **Diluizione del campione** descritte nella sezione **AMPLIFICAZIONE E RILEVAZIONE**.

Nota: *se lo stock di DNA campione a disposizione non è sufficiente per eseguire una nuova diluizione, recuperare una nuova sezione di tessuto di 5 µm ed estrarre nuovamente il DNA con il cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), quindi eseguire il Passaggio B descritto di seguito.*

- B. Dopo avere eseguito la diluizione dello stock di DNA fino a 5 ng/µl, come descritto nella sezione **Diluizione dei campioni**, eseguire un'ulteriore diluizione 1:2 utilizzando 20 µl dello stock di DNA diluito e aggiungendovi 20 µl di diluente **DNA SD**.
- C. Proseguire con la **Preparazione della soluzione di lavoro Master Mix (MMX)** e con i passaggi restanti della procedura di amplificazione e rilevazione.

Nota: *se il campione è ancora non valido dopo la ripetizione del test con diluizione 1:2, ripetere l'intera procedura del test per il campione in questione, a partire dall'estrazione del DNA, utilizzando il cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) con una nuova sezione FFPE di 5 µm. Per l'amplificazione e la rilevazione è opportuno utilizzare il volume standard di DNA, ovvero 25 µl a 5 ng/µl (senza ulteriore diluizione).*

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni seduta è necessario includere il controllo mutante (**BRAF MUT**) e il controllo wild-type (**BRAF WT**) del test **cobas BRAF**. Una seduta è valida se è valido lo stato del pozzetto del controllo **BRAF MUT (A01)** e del pozzetto del controllo **BRAF WT (B01)**. Se uno dei due pozzetti dei controlli **BRAF MUT** o **BRAF WT** non è valido, la seduta deve essere ripetuta. Preparare una diluizione fresca dello stock di DNA campione estratto in precedenza, in modo da allestire una nuova micropiastra con i controlli per l'amplificazione e la rilevazione.

Controllo BRAF mutante

Il controllo **BRAF MUT** deve produrre un risultato "Valid". Se i risultati del controllo **BRAF MUT** sono costantemente non validi, richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

Controllo BRAF wild-type

Il controllo **BRAF WT** deve produrre un risultato "Valid". Se i risultati del controllo **BRAF WT** sono costantemente non validi, richiedere assistenza tecnica all'ufficio Roche locale.

PRECAUZIONI PROCEDURALI

Com'è auspicabile per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alla buona prassi di laboratorio. Data l'elevata sensibilità analitica dei test basati su PCR, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

LIMITI DELLA PROCEDURA

1. Analizzare soltanto i tipi di campioni indicati. Il test **cobas BRAF** è stato validato soltanto per l'uso con campioni FFPE di melanoma e carcinoma tiroidale papillare.
2. Il test **cobas BRAF** è stato validato soltanto per l'estrazione del DNA genomico con il prodotto **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (Roche M/N: 05985536190).
3. La rilevazione di una mutazione dipende dal numero di copie di sequenze mutanti presenti nel campione e può essere influenzata dall'integrità del campione, dalla quantità di DNA estratto e dalla presenza di sostanze interferenti.
4. L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di fissazione, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Seguire le procedure descritte in questo foglio illustrativo e nel Manuale Operativo del **cobas® 4800 System** o nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.
5. Sebbene l'aggiunta dell'enzima AmpErase alla miscela di reazione del test **cobas BRAF** garantisca l'amplificazione selettiva del DNA target, è necessario evitare la contaminazione dei reagenti attenendosi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte nel presente foglio illustrativo.
6. L'uso di questo prodotto deve essere consentito esclusivamente a personale adeguatamente addestrato nelle tecniche PCR e nell'uso del **cobas® 4800 System**.
7. L'uso di questo prodotto è stato validato soltanto con il **cobas® 4800 System**. Non è stato approvato l'uso di questo prodotto con altri sistemi per PCR.
8. A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori allo scopo di qualificare tali differenze.
9. Non sono stati valutati gli effetti di altre potenziali variabili, ad esempio la fissazione dei campioni.
10. Anche se rare, le mutazioni e le varianti comprese nelle regioni del gene BRAF coperte dai primer o dalle sonde utilizzate nel test **cobas BRAF** possono ostacolare l'amplificazione dell'allele BRAF V600 o la rilevazione della presenza della mutazione nel codone 600.
11. L'eventuale presenza di inibitori della PCR può produrre risultati falsi negativi o non validi.
12. La melanina è un noto inibitore delle reazioni PCR. Il kit di estrazione dei campioni di DNA rimuove la melanina dal campione durante la procedura; ma la melanina può determinare comunque risultati non validi. Se si sospetta un'inibizione da melanina, si suggerisce di ripetere il test con una diluizione 1:2, come descritto nella sezione "Ripetizione del test sui campioni con risultati non validi".

13. Il test **cobas** 4800 per la mutazione BRAF V600 è caratterizzato da una reattività crociata limitata con campioni contenenti mutazioni diverse dalla mutazione V600E (V600K, V600D e V600E2). Per maggiori dettagli, fare riferimento alla sezione "Melanoma - Valutazione delle prestazioni non cliniche".
14. I campioni FFPET che contengono DNA degradato potrebbero compromettere la capacità del test di rilevare la mutazione.
15. Il test **cobas** 4800 per la mutazione BRAF è un test di tipo qualitativo. Il test non può essere utilizzato per effettuare misurazioni quantitative della mutazione.

I. MELANOMA

VALUTAZIONE DEL RENDIMENTO NON CLINICO

Per gli studi non clinici descritti di seguito, la percentuale di contenuto tumorale è stata valutata tramite un riesame patologico, mentre il contenuto di melanina è stato valutato tramite un riesame patologico e un saggio prodotto internamente per la determinazione della melanina. Per la selezione dei campioni da analizzare è stato utilizzato il sequenziamento bidirezionale di Sanger. Il livello percentuale della mutazione è stato determinato attraverso il sequenziamento 454 (metodo quantitativo di pirosequenziamento massivamente parallelo).

Sensibilità analitica

Sensibilità analitica - limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD)

La quantità minima di DNA iniziale in grado di produrre risultati corretti nel 95% dei casi è stata valutata utilizzando pannelli di diluizione preparati con tre tipi di campioni:

- Miscele di campioni preparate mescolando stock di DNA ottenuti da campioni FFPET contenenti la mutazione BRAF V600E e da campioni FFPET contenenti BRAF wild-type in modo da ottenere livelli di mutazione specifici.
- Stock di DNA FFPET individuali preparati con tre campioni FFPET contenenti la mutazione BRAF V600E.
- Miscela di linea cellulare preparata mescolando stock di DNA ottenuti da una linea cellulare con mutazione BRAF V600E e da una linea cellulare con BRAF wild-type.

Tutti i campioni utilizzati in questo studio sono stati sottoposti a sequenziamento 454 al fine di determinare la mutazione percentuale di ogni campione.

Sensibilità analitica con le miscele di campioni

Gli stock di DNA campione FFPET con mutazione BRAF V600E sono stati miscelati con gli stock di DNA campione FFPET con BRAF wild-type in modo da ottenere un campione con livello di mutazione ~10%, tre campioni con livello di mutazione ~5% e un campione con livello di mutazione ~3%. È stato inoltre analizzato un campione con BRAF wild-type. Dopo la creazione della miscela, sono stati verificati i livelli di mutazione applicando il sequenziamento 454. Ognuna delle cinque miscele di campioni contenenti la mutazione V600E (ma non il campione wild-type) è stata successivamente diluita in modo da ottenere i componenti del pannello descritti in dettaglio nella Tabella 3.

Tabella 3
Preparazione dei componenti del pannello di diluizione con le miscele di campioni

Miscela	Mutazione % media*	Quantità di DNA nei componenti del pannello di diluizione (ng/25 µl)**
Miscela, 10%	9% (n = 6)	125, 62,5, 31,3
Miscela 1, 5%	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
Miscela 2, 5%	5% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
Miscela 3, 5%	6% (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
Miscela, 2,5%	3% (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0% (solo wild-type)	- - -	125

* Mutazione percentuale media della miscela, confermata dal sequenziamento 454.

** Quantità di DNA genomico contenuta in ogni componente del pannello. Il volume iniziale del campione da sottoporre al test è di 25 µl.

Sono state eseguite 8 repliche per ogni membro del pannello utilizzando ciascuno dei 3 lotti del kit del test **cobas** BRAF (n = 24/membro pannello). Nella Tabella 4 è indicata la sensibilità di ogni miscela FFPET, determinata in base alla quantità minima di DNA che ha prodotto una percentuale di almeno il 95% di risultati Mutation Detected relativamente alla mutazione BRAF V600E (righe ombreggiate).

Tabella 4
Sensibilità del test cobas BRAF con le miscele di campioni FFPET

Miscela FFPET	Mutazione percentuale in base al sequenziamento 454	Quantità di DNA nel componente del pannello	Percentuale "Mutation Detected" (n = 24)
Miscela FFPET, 10%	9%	125 ng/25 µl	100%
		62,5 ng/25 µl	100%
		31,3 ng/25 µl	100%
Miscela FFPET 1, 5%	5%	125 ng/25 µl	96%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	75%
		0,6 ng/25 µl	88%
		0,3 ng/25 µl	71%
Miscela FFPET 2, 5%	5%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	92%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	96%
		0,6 ng/25 µl	58%
		0,3 ng/25 µl	50%
Miscela FFPET 3, 5%	6%	125 ng/25 µl	100%
		5,0 ng/25 µl	100%
		2,5 ng/25 µl	100%
		1,3 ng/25 µl	100%
		0,6 ng/25 µl	96%
		0,3 ng/25 µl	71%
Miscela FFPET, 2,5%	3%	125 ng/25 µl	0%
		62,5 ng/25 µl	4%
		31,3 ng/25 µl	4%
0% (wild-type)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Questo studio dimostra che il test **cobas** BRAF è in grado di rilevare la mutazione BRAF V600E con un livello di concentrazione $\geq 5\%$ utilizzando il volume iniziale raccomandato, pari a 125 ng/25 µl. La capacità del test di rilevare la mutazione quando il volume di DNA iniziale è più basso dimostra che la mutazione viene comunque rilevata, anche nel caso in cui i campioni contengano DNA degradato a causa del processo di fissazione. Il campione contenente BRAF wild-type ha generato tutti risultati "Mutation Not Detected".

Sensibilità analitica con i campioni FFPET

Per confermare che il test è in grado di rilevare la mutazione nei campioni dei pazienti a una concentrazione del 5%, sono stati utilizzati 3 lotti del kit per l'estrazione del DNA (**cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit) per analizzare 48 sezioni da 5 µm ottenute da ognuno dei 3 campioni FFPET con mutazione BRAF V600E contenenti livelli di mutazione del 6%, del 12% e del 4%. Per valutare l'impatto della melanina sul saggio, è stato utilizzato un campione (con mutazione al 6%) con una concentrazione elevata di melanina. Da ogni sezione sono state preparate diluizioni seriali del DNA per realizzare un pannello con 6 componenti (Tabella 5).

Tabella 5
Preparazione dei componenti del pannello di diluizione con i campioni FFPET

Campioni FFPET	Informazioni sui campioni		Quantità di DNA nei componenti del pannello di diluizione (ng/25 µl)
	Mutazione V600E % media*	Pigmentazione	
Campione 1	6%	Fortemente pigmentato**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Campione 2	12%	NFP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Campione 3	4%	NFP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* Mutazione percentuale media dei campioni determinata tramite sequenziamento 454

** Fortemente pigmentato (in base alla valutazione visiva); concentrazione di melanina = 0,17 µg/25 µl

*** NFP = non fortemente pigmentato (sulla base di una valutazione visiva)

Sono state eseguite 16 repliche per ogni membro del pannello utilizzando ciascuno dei 3 lotti del kit del test **cobas** BRAF (n = 48/membro pannello). La sensibilità per ogni campione FFPET è stata determinata in base alla quantità più bassa di DNA ad aver prodotto almeno il 95% di risultati Mutation Detected per la mutazione BRAF V600E (righe ombreggiate). I risultati dello studio sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6
Sensibilità del test cobas BRAF con i campioni FFPET

Campioni FFPET	Mutazione percentuale in base al sequenziamento 454	Quantità di DNA nel componente del pannello	Percentuale "Mutation Detected" (n = 48)
Campione 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	98%
		2,0 ng/25 µl	81%
		1,0 ng/25 µl	71%
Campione 2	12%	125 ng/25 µl	100%
		7,8 ng/25 µl	100%
		3,9 ng/25 µl	100%
		2,0 ng/25 µl	98%
		1,0 ng/25 µl	98%
		0,5 ng/25 µl	94%
Campione 3	4%	125 ng/25 µl	98%
		31,3 ng/25 µl	98%
		15,6 ng/25 µl	85%
		7,8 ng/25 µl	90%
		3,9 ng/25 µl	90%
		2,0 ng/25 µl	67%

Questo studio ha dimostrato che il test **cobas** BRAF è in grado di rilevare la mutazione BRAF V600E nei campioni FFPET clinici veri e propri con un livello di mutazione $\geq 5\%$ utilizzando il volume iniziale raccomandato, pari a 125 ng/25 µl. La capacità del test di rilevare la mutazione quando il volume di DNA iniziale è più basso dimostra che la mutazione viene comunque rilevata, anche nel caso in cui i campioni contengano DNA degradato a causa del processo di fissazione. La presenza nello studio di un campione fortemente pigmentato non sembra aver influenzato la sensibilità del test.

Sensibilità analitica con una miscela di linee cellulari

Gli stock di DNA ottenuti da due linee cellulari di melanoma [SK-MEL 28 (mutazione BRAF V600E) e SK-MEL 2 (BRAF wild-type)] sono stati miscelati in modo da ottenere un campione con un livello di mutazione del 5% confermato applicando il sequenziamento 454. Sono stati preparati tre pannelli di diluizione distinti, contenenti una quantità di DNA compresa tra 125 ng/25 µl e 0 ng/25 µl. Ogni componente del pannello è stato analizzato venti (20) volte utilizzando 3 lotti di kit del test **cobas** BRAF (totale = 60). La sensibilità è stata determinata in base alla quantità più bassa di DNA ad aver prodotto almeno il 95% di risultati "Mutation Detected" per la mutazione BRAF V600E (riga ombreggiata). I risultati dello studio sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 7
Sensibilità del test cobas BRAF con una miscela di linee cellulari

Miscela di linee cellulari	Mutazione percentuale media in base al sequenziamento 454	Quantità di DNA nel componente del pannello	Percentuale "Mutation Detected" (n = 60)
Miscela di linee cellulari	5%	125,0 ng/25 µl	97%
		31,3 ng/25 µl	100%
		15,6 ng/25 µl	95%
		7,8 ng/25 µl	98%
		3,9 ng/25 µl	95%
		2,0 ng/25 µl	82%
		1,0 ng/25 µl	78%
		0,5 ng/25 µl	77%

Il test **cobas** BRAF ha generato il 95% di risultati "Mutation Detected" ad una concentrazione di 3,9 ng/25 µl, ovvero con una diluizione 1:32 del volume iniziale di DNA raccomandato, che è di 125 ng/25 µl. Ciò suggerisce che il test è in grado di rilevare la mutazione BRAF V600E anche in presenza di un 97% circa di DNA degradato dal processo di fissazione, presumendo che il DNA della linea cellulare contenga il 100% di DNA amplificabile e intatto.

Intervallo di DNA genomico iniziale

Il volume di DNA iniziale raccomandato per il test **cobas** BRAF è di 125 ng. Le quantità iniziali di DNA genomico potrebbero variare per effetto di eventuali errori di quantificazione del DNA e/o di una variazione della quantità di DNA degradato. Per poter valutare se la variazione della quantità di DNA genomico iniziale può incidere o meno sul test, si è proceduto all'estrazione del DNA genomico da 11 campioni FFPET di melanoma selezionati in base al loro stato mutazionale e al livello di pigmentazione, dopodiché si è eseguita una diluizione seriale dei campioni iniziali a 250 ng, 125 ng, 62,5 ng e 31,3 ng/25 µl. Tutti e 4 questi livelli di DNA genomico iniziale sono stati valutati utilizzando 2 lotti, ottenendo esattamente i risultati attesi.

Contenuto tumorale minimo

Sono stati analizzati trentatré (33) campioni contenenti la mutazione BRAF V600E allo scopo di determinare qual è la porzione tumorale minima necessaria per poter rilevare la mutazione BRAF V600E in campioni con contenuto tumorale compreso tra 5% e 50% senza macrodissezione. Il test **cobas** BRAF è stato utilizzato per analizzare una (1) sezione di ogni campione.

Il test **cobas** BRAF ha individuato correttamente tutti i campioni con mutazione BRAF V600E caratterizzati da una percentuale minima di DNA mutante superiore al 5% e da un contenuto tumorale minimo di almeno il 15%, come illustrato nella Tabella 8. I campioni caratterizzati da un contenuto tumorale inferiore al 15% e da un livello di mutazione inferiore al 5% hanno prodotto risultati "Mutation Not Detected". Altri 24 campioni wild-type caratterizzati da un contenuto tumorale compreso tra il 5% e il 45% sono stati inoltre valutati con il livello di concentrazione di DNA iniziale raccomandato, ovvero 125 ng/25 µl. Tutti i campioni wild-type sono stati identificati correttamente. È necessario eseguire la macrodissezione dei campioni con contenuto tumorale < 50% per area.

Tabella 8
Risultati dei test eseguiti su 33 campioni con mutazione BRAF V600E a vari livelli percentuali di contenuto tumorale e mutazione

N. campione	Contenuto tumorale*	% mutazione	Risultato del test
1	5% / 5%	3%	Mutation Not Detected
2	5% / 5%	5%	Mutation Not Detected
3	5% / 5%	1%	Mutation Not Detected
4	10% / 10%	4%	Mutation Not Detected
5	10% / 10%	14%	Mutation Detected
6	15% / 10%	6%	Mutation Detected
7	15% / 15%	23%	Mutation Detected
8	15% / 15%	3%	Mutation Detected

N. campione	Contenuto tumorale*	% mutazione	Risultato del test
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

** Il contenuto tumorale dei singoli campioni è stato valutato da un patologo, che ha esaminato la prima e l'ultima sezione delle dodici sezioni adiacenti da 5 µm. È riportato il contenuto tumorale della prima e dell'ultima sezione (ad esempio, 95%/95%).*

Reattività crociata

La reattività crociata del test **cobas** BRAF è stata valutata analizzando i seguenti tipi di campioni:

- Campioni FFPET di melanoma con mutazioni BRAF non V600E a vari livelli di mutazione,
- Plasmidi di mutazioni BRAF non V600E,
- Plasmidi di omologhi di BRAF,
- Microorganismi cutanei.

La reattività crociata è stata inoltre valutata determinando se la presenza di plasmidi di omologhi BRAF o di microorganismi cutanei abbia o meno interferito con la rilevazione della mutazione BRAF V600E.

Campioni FFPET di melanoma con mutazione BRAF non V600E

Con il test **cobas** BRAF sono stati analizzati in triplice copia 14 campioni FFPET di melanoma con mutazioni BRAF non V600E (V600D, V600E2, V600R o V600K). Per otto campioni con mutazioni BRAF non V600E, la reattività crociata con il test **cobas** BRAF è stata riscontrata in tutte e tre le repliche. Questi otto campioni contenevano il mutante BRAF V600D (mutazione al 18%), il mutante BRAF V600E2 (mutazione al 68%) o il mutante BRAF V600K (mutazione > 30%). Non è stata invece registrata nessuna reattività crociata con i campioni contenenti la mutazione BRAF V600R (mutazione 23%), come illustrato nella Tabella 9.

Tabella 9

Percentuali di risultati “Mutation Detected” del test cobas BRAF relativi a mutazioni BRAF non V600E in campioni FFPET

N. campione	Stato mutazione BRAF	Mutazione percentuale	Contenuto tumorale*	Stadio tumorale	Percentuale “Mutation Detected” (n = 3)
1	V600D	18%	30% / 30%	IV	100%
2	V600E2	16%	75% / 75%	IV	0%
3		36%	75% / 80%	III	0%
4		68%	75% / 75%	IV	100%
5	V600R	23%	15% / 15%	IV	0%
6	V600K	17%	25% / 25%	III	0%
7		22%	35% / 40%	IV	0%
8		23%	40% / 40%	IV	0%
9		31%	60% / 60%	IV	100%
10		35%	75% / 75%	IV	100%
11		39%	80% / 80%	IV	100%
12		36%	95% / 95%	IIC	100%
13		62%	75% / 75%	IV	100%
14		69%	80% / 80%	IV	100%

* Il contenuto tumorale dei singoli campioni è stato valutato da un patologo, che ha esaminato la prima e l'ultima sezione delle dodici sezioni adiacenti da 5 µm. È riportato il contenuto tumorale della prima e dell'ultima sezione (ad esempio, 95%/95%).

È stato preparato un pannello di diluizione di undici componenti con concentrazioni di DNA comprese tra 5,0 ng/µl e 0,0049 ng/µl (equivalenti all'intervallo 125-0,1 ng di volume iniziale di DNA raccomandato per 25 µl). Ogni componente del pannello è stato analizzato tre volte per poter determinare la quantità minima di DNA in grado di generare il 100% di risultati “Mutation Detected” per gli otto campioni che avevano determinato una reazione crociata con il test **cobas** BRAF. Il livello più basso di DNA iniziale prima del quale è stata osservata una perdita della reattività crociata dei campioni sembra essere compreso tra un valore minimo pari a 0,5 ng/25 µl per un campione mutante BRAF V600K e un livello di mutazione del 69% e un valore massimo pari a 15,6 ng/25 µl per un campione BRAF V600D e un livello di mutazione del 18% (Tabella 10).

Tabella 10

Livello minimo di DNA iniziale che consente di rilevare la reattività crociata del test cobas BRAF

N. campione	Stato mutazione BRAF	Mutazione percentuale	Volume minimo di DNA iniziale prima della perdita di reattività crociata (n = 3)
1	V600D	18%	15,6 ng/25 µl
2	V600E2	68%	7,8 ng/25 µl
3	V600K	31%	3,9 ng/25 µl
4		35%	3,9 ng/25 µl
5		39%	3,9 ng/25 µl
6		36%	2,0 ng/25 µl
7		62%	3,9 ng/25 µl
8		69%	0,5 ng/25 µl

Plasmidi BRAF non V600E

Sono stati preparati pannelli di diluizione dei plasmidi con livelli di mutazioni compresi tra il 5% e il 75% in un fondo di plasmide wild-type per le 9 mutazioni BRAF non V600E seguenti: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K e V600R. Ogni componente dei pannelli di diluizione preparati per ogni plasmide è stato analizzato in triplice copia con il test **cobas** BRAF. La reattività crociata è stata riscontrata in tutte e tre le repliche per il plasmide BRAF V600D con mutazione $\geq 10\%$; per il plasmide BRAF V600K con mutazione $\geq 35\%$ e per il plasmide BRAF V600E2 con mutazione $\geq 65\%$. Non è stata riscontrata nessuna reattività crociata con i plasmidi delle altre sei mutazioni BRAF prese in esame.

Plasmidi di omologhi di BRAF

Sono stati preparati campioni per i tre plasmidi di omologhi di BRAF (Pseudogene BRAF, ARAF e RAF1), per il plasmide mutante BRAF V600E e per il plasmide BRAF wild-type, come illustrato nella Tabella 11. Ogni componente del pannello è stato analizzato fra tre e sei volte con il test **cobas** BRAF.

Tabella 11
Campioni plasmidi di omologhi di BRAF

Pannello		Composizione per volume	
Nome	Membro	Componente 1	Componente 2
Pseudogene BRAF	1	Pseudogene BRAF, 95%	Mutante BRAF V600E, 5%
	2	Pseudogene BRAF, 100%	---
ARAF	1	ARAF, 95%	Mutante BRAF V600E, 5%
	2	ARAF, 100%	---
RAF1	1	RAF1, 95%	Mutante BRAF V600E, 5%
	2	RAF1, 100%	---
Controllo	1	BRAF wild-type, 95%	Mutante BRAF V600E, 5%
	2	BRAF wild-type, 100%	---
	3	Tampone di eluizione del DNA, 95%	Mutante BRAF V600E, 5%

Il test **cobas** BRAF non ha rilevato nessuno dei tre plasmidi omologhi di BRAF analizzato da solo: ciò indica che i plasmidi omologhi di BRAF non generano una reazione crociata con il test.

Il plasmide mutante BRAF V600E con livello di mutazione del 5% in presenza del 95% di plasmidi di omologhi BRAF ha prodotto i risultati "Mutation Detected" attesi in tutti i casi: ciò indica che i plasmidi di omologhi non interferiscono con la rilevazione della mutazione BRAF V600E.

Microorganismi cutanei

I seguenti microorganismi cutanei non hanno determinato una reazione crociata con il test **cobas** BRAF quando sono stati aggiunti ad un campione FFPET di melanoma wild-type e ad una concentrazione di 1×10^6 CFU durante la fase di lisi del tessuto:

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

Inoltre i microorganismi presi in esame non hanno interferito con la rilevazione di un campione FFPET con mutazione BRAF V600E all'8% quando sono stati aggiunti ad una concentrazione di 1×10^6 CFU durante la fase di lisi del tessuto.

Interferenze

I trigliceridi (≤ 74 mM, pari a 2 volte la concentrazione alta raccomandata dal CLSI¹⁷), l'emoglobina (≤ 2 mg/ml, pari a 1 volta la concentrazione alta raccomandata dal CLSI¹⁷) e $\leq 95\%$ di tessuto necrotico non hanno interferito con il test **cobas** BRAF quando la sostanza potenzialmente interferente è stata aggiunta durante la fase di lisi della procedura di preparazione del campione.

Melanina

È stata eseguita una valutazione dell'impatto di concentrazioni elevate di melanina endogena utilizzando campioni FFPET di melanoma fortemente pigmentati. Sono stati selezionati in totale 41 campioni FFPET di tessuto tumorale di melanoma sulla base del livello di pigmentazione osservato: 33 campioni fortemente pigmentati, 3 campioni di individui afro-americani e 5 campioni lievemente pigmentati a confronto. Dal tessuto è stato estratto il DNA e, per ogni campione, è stata determinata la concentrazione di melanina. Lo stock di DNA ottenuto da ognuna delle due sezioni ricavate dai 41 campioni è stato analizzato una volta. Tre campioni hanno prodotto risultati non validi. Un campione ha prodotto un risultato "Mutation Not Detected", ma in seguito si è appurato che il livello di concentrazione del campione era inferiore al limite di sensibilità. I 3 campioni che hanno generato risultati "Invalid" sono stati utilizzati per preparare la concentrazione di DNA raccomandata per il test, oltre che per preparare diluizioni di due, quattro o otto volte il volume di DNA iniziale raccomandato, che è pari a 125 ng/PCR. I campioni di DNA così diluiti (contenenti in totale 125 ng,

61,5 ng, 31,25 ng o 15,6 ng di DNA in 25 µl) sono stati nuovamente analizzati per determinare se la riduzione del livello di melanina dovuta alla diluizione consentiva o meno di ottenere risultati comunque validi. Tutti e tre i campioni diluiti 2 volte hanno generato i risultati corretti.

Tabella 12
Riepilogo delle prestazioni del test cobas BRAF con campioni FFPET di melanoma pigmentati

ID campione	Diluizione	Livello di melanina nel campione/PCR	Risultato
1	Nessuna (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Due volte (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Quattro volte (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Otto volte (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Nessuna (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Due volte (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Quattro volte (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Otto volte (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Nessuna (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Due volte (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Quattro volte (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Otto volte (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

I risultati ottenuti analizzando i 17 campioni wild-type dimostrano che a tutti i campioni era stato correttamente assegnato il risultato "Mutation Not Detected", con l'eccezione di 2 campioni fortemente pigmentati che hanno generato risultati falsi positivi.

PRESTAZIONI CLINICHE

Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità del test **cobas BRAF** è stato realizzato uno studio al quale hanno contribuito 3 diversi siti di analisi (2 operatori per ogni sito), 3 lotti di reagenti e 5 giornate di lavoro non consecutive. È stato analizzato un pannello costituito a 8 componenti, ovvero campioni di DNA ottenuti da sezioni FFPET di melanoma maligno. Il pannello includeva sia campioni pigmentati, sia campioni non pigmentati, nonché un intervallo specifico di valori relativamente al contenuto tumorale percentuale e alle percentuali di alleli mutanti. Nel pannello era incluso anche un campione con il livello di sensibilità (LoD) esatto del 5%. Le sedute valide sono state 92 su un totale di 94 (97,9%). 2 campioni hanno generato risultati non validi su un totale di 1442 campioni analizzati (0,14%). Per il 100% dei test validi sono stati identificati correttamente tutti i componenti del pannello (tranne i campioni LoD), inclusi i componenti del pannello con un livello di mutazione del 20% e due componenti del pannello classificati come fortemente pigmentati. Per il componente LoD del pannello, la mutazione V600E è stata rilevata nel 90% dei campioni (162 su 180). Non sono stati generati falsi positivi per nessuno dei campioni WT analizzati. In sintesi è stata dimostrata l'elevata riproducibilità del test **cobas BRAF**, con i campioni pigmentati e con i campioni non pigmentati, con i campioni a basso contenuto tumorale e con basse percentuali di alleli mutanti, con i diversi siti di analisi, operatori, lotti di reagenti e giorni di lavoro. La specificità analitica è stata del 100%.

Correlazione con il metodo di riferimento per i campioni della sperimentazione clinica Fase III

La prevalenza della mutazione V600E nella sperimentazione clinica Fase III è stata del 46,5%, sulla base dei risultati ottenuti con il test **cobas** BRAF. Ciò è coerente con quanto affermato dalla letteratura con riferimento alla prevalenza della mutazione V600E nei pazienti affetti da melanoma.

Per valutare le prestazioni del test **cobas** BRAF rispetto al doppio sequenziamento bidirezionale (di Sanger), sono stati selezionati 596 pazienti consecutivi sottoposti a screening per la sperimentazione clinica di Fase III del vemurafenib, identificati in base ai dati clinici, anagrafici e al sequenziamento di Sanger. Di questi pazienti, 94 non sono stati ammessi perché non soddisfacevano tutti i criteri di inclusione, 4 perché non disponevano di un riesame patologico, 2 perché avevano ottenuto risultati non validi per il test **cobas** BRAF. Tra gli altri 496 pazienti ritenuti idonei, 47 hanno prodotto campioni con risultati non validi per il sequenziamento di Sanger, pertanto i casi valutabili sono stati 449. Nella Tabella 13 riportata di seguito sono indicati i dati dell'analisi della concordanza tra i risultati del test **cobas** BRAF e i risultati del sequenziamento di Sanger ai fini della rilevazione della mutazione V600E.

Tabella 13

Riepilogo dei risultati del test **cobas** BRAF rispetto ai risultati del sequenziamento di Sanger

cobas BRAF Test (metodo di analisi)	Sequenziamento di Sanger (metodo di riferimento)		
	BRAF V600E Mutation Detected ^a	BRAF V600E Mutation Not Detected ^b	Totale
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Totale	222	227	449
Concordanza percentuale positiva (IC 95%)	$100\% \times 216/222 = 97,3\%$ (94,2%, 98,8%)		
Concordanza percentuale negativa (IC 95%)	$100\% \times 192/227 = 84,6\%$ (79,3%, 88,7%)		
Concordanza percentuale totale (IC 95%)	$100\% \times 408/449 = 90,9\%$ (87,8%, 93,2%)		

^a Il risultato "Mutation Detected" indica la presenza del tipo di mutazione BRAF predominante, V600E (1799 T>A), identificato con il metodo di Sanger.

^b Il risultato "Mutation Not Detected" indica l'assenza del tipo di mutazione BRAF predominante (V600E) identificato con il metodo di Sanger (ovvero wild-type o nessuna mutazione, V600D, V600E2, V600K, V600R o altre mutazioni).

Nota: campioni di melanoma con risultati validi sia in base al test **cobas** BRAF che in base al metodo di Sanger.

Nota: IC = intervallo di confidenza (percentuale).

Tutti i 41 campioni che hanno generato risultati discordanti tra il test **cobas** BRAF e il sequenziamento di Sanger sono stati sottoposti al sequenziamento 454 (pirosequenziamento quantitativo massivamente parallelo) come secondo metodo di riferimento. Inoltre 33 campioni con risultati discordanti tra il test **cobas** BRAF e il sequenziamento di Sanger sono stati analizzati con il sequenziamento 454. Nella Tabella 14 sono riportati i risultati dell'analisi della concordanza secondaria dopo la risoluzione della discordanza.

Per quanto riguarda i 6 campioni discordanti che avevano generato risultati Mutation Not Detected con il test **cobas** BRAF e risultati positivi per la mutazione V600E con il sequenziamento di Sanger, il sequenziamento 454 ha generato risultati wild-type per 5 campioni su 6 (un campione è risultato non valido con il sequenziamento 454).

Per quanto riguarda gli 8 campioni discordanti, su un totale di 35, che avevano generato un risultato "Mutation Detected" con il test **cobas** BRAF e un risultato WT con il sequenziamento di Sanger, il sequenziamento 454 ha riconosciuto la mutazione V600E in 7 campioni su 8 (un campione è risultato non valido con il sequenziamento 454).

Per quanto riguarda i 27 campioni discordanti, su un totale di 35, che avevano generato un risultato "Mutation Detected" con il test **cobas** BRAF e un risultato positivo per una mutazione non V600E con il sequenziamento di Sanger, il sequenziamento 454 ha riconosciuto mutazione V600K in 24 campioni, la mutazione V600E2 in un campione e la mutazione V600E in un campione. Nel caso di 1 campione, il metodo di Sanger ha rilevato la mutazione V600D mentre il sequenziamento 454 ha generato un risultato wild-type.

La reattività crociata del test **cobas** BRAF per la mutazione V600K è stata del 66% (25 su 38).

La concordanza con il sequenziamento 454 è stata del 100% per i 33 campioni V600E e WT concordanti tra il test **cobas** BRAF e il sequenziamento di Sanger.

Tabella 14

Risultati del test cobas BRAF rispetto al sequenziamento di Sanger dopo la risoluzione della discordanza mediante sequenziamento 454

cobas BRAF Test (metodo di analisi)	Dopo la risoluzione della discordanza mediante sequenziamento 454		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Totale
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Totale	225	224	449
Concordanza percentuale positiva (IC 95%)	100% × 224/225 = 99,6% (97,5%, 99,9%)		
Concordanza percentuale negativa (IC 95%)	100% × 197/224 = 87,9% (83,0%, 91,6%)		
Concordanza percentuale totale (IC 95%)	100% × 421/449 = 93,8% (91,1%, 95,7%)		

Distribuzione delle mutazioni nel codone 600 del gene BRAF

È stata analizzata la distribuzione delle mutazioni nel codone 600 rispetto ai 496 casi idonei sulla base dei risultati compositi ottenuti da metodo di Sanger e sequenziamento 454. Di questi 496 casi, 182 casi erano wild-type e 314 casi erano mutanti. Nella Tabella 15 è riportata la distribuzione delle mutazioni nel codone 600 per quanto riguarda i 314 casi positivi alle mutazioni. Le mutazioni V600K sono state riscontrate nel 13,4% dei casi totali con mutazioni nel codone 600.

Tabella 15

Distribuzione delle mutazioni nel codone 600 del gene BRAF rispetto alla popolazione positiva alle mutazioni, come rilevato dal metodo Sanger e/o dal sequenziamento 454

Sequenza di aminoacidi (codone 600)	Sequenza di nucleotidi (1798-1800)	N	Distribuzione %
V600E	GAG	255	81,2
V600K	AAG	42	13,4
V600E2	GAA	13	4,1
V600R	AGG	3	1,0
V600D	GAC	1	0,3
Totale mutanti in codone 600		314	100
Totale wild-type in codone 600		182	---

Efficacia clinica dello ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

Il test **cobas** BRAF è stato utilizzato come strumento di supporto per la selezione dei pazienti da sottoporre a terapia con ZELBORAF®. La sicurezza e l'efficacia clinica dello ZELBORAF® sono state dimostrate dallo studio NO25026 (BRIM3), una sperimentazione clinica internazionale, randomizzata, di Fase III, aperta, multicentrica e controllata, realizzata su pazienti non trattati in precedenza affetti da melanoma in stadio IIIC non resecabile o in stadio IV con una mutazione BRAF V600E. Lo scopo dello studio era valutare l'efficacia clinica dello ZELBORAF® rispetto alla dacarbazina (terapia di cura standard). I campioni FFPE di tutti i pazienti affetti da melanoma presi in considerazione per la terapia sono stati analizzati con il test **cobas** BRAF. I pazienti con risultato del test "Mutation Detected" sono stati ritenuti idonei all'ammissione allo studio clinico sul farmaco se in possesso degli altri requisiti necessari. I pazienti con risultato del test "Mutation Not Detected" sono stati ritenuti non idonei all'ammissione allo studio clinico. Lo studio è stato condotto presso circa 104 siti in tutto il mondo (22 centri negli USA).

Alla sperimentazione sono stati ammessi 675 pazienti: 337 hanno seguito la terapia con vemurafenib e 338 la terapia con dacarbazina. I principali parametri di valutazione dell'efficacia della sperimentazione erano la sopravvivenza totale (*Overall Survival*, OS) e la sopravvivenza libera da progressione della malattia (*Progression-Free Survival*, PFS), in base alla valutazione degli sperimentatori. Un altro parametro considerato è stato il miglior tasso di risposta globale confermato, in base alla valutazione degli sperimentatori.

Le caratteristiche dei livelli di partenza sono state bilanciate tra i gruppi di terapie. La maggioranza dei pazienti erano maschi (56%) e caucasici (99%), l'età mediana era 54 anni (il 24% ≥ 65 anni); lo stato delle prestazioni ECOG di tutti i pazienti era di 0 o 1 e la maggioranza dei pazienti presentava metastasi (95%).

I risultati dell'efficacia della sperimentazione sono illustrati nella Tabella 16 e nella Figura 2:

Tabella 16

Efficacia del vemurafenib nei pazienti non trattati in precedenza affetti da melanoma con mutazione BRAFV600E⁹

	Vemurafenib (N = 337)	Dacarbazina (N = 338)	Valore p^d
Sopravvivenza totale			
Numero di decessi	78 (23%)	121 (36%)	-
Rapporto di rischio (IC 95%) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Sopravvivenza mediana (mesi) (IC 95%) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Follow-up mediano (mesi) (intervallo)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Rapporto di rischio per sopravvivenza libera da progressione della malattia (IC 95%) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
PFS mediana (mesi) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a Come rilevato dal test **cobas** BRAF

^b Rapporto di rischio (HR) stimato tramite il modello di Cox; un rapporto di rischio < 1 è favorevole al vemurafenib

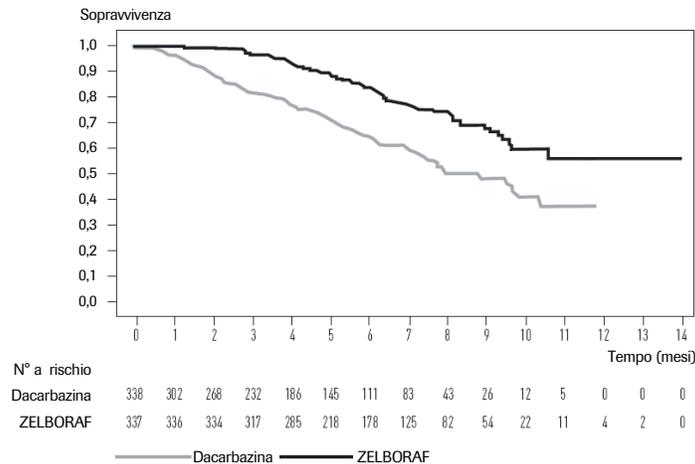
^c Stima di Kaplan-Meier

^d Test log-rank non stratificato

^e Non raggiunto

Figura 2

Curve di Kaplan-Meier della sopravvivenza totale - Pazienti non trattati in precedenza



Il tasso di risposta totale confermato, in base alla valutazione degli sperimentatori, è stato del 48,4% (IC 95%: 41,6%, 55,2%) per il braccio ZELBORAF[®] e del 5,5% (IC 95%: 2,8%, 9,3%) per il braccio dacarbazina.

Efficacia clinica del COTELLIC[®] (cobimetinib)^{10, 11}

Il COTELLIC[®], un inibitore della MEK, è stato testato in uno studio clinico (coBRIM) in associazione con lo ZELBORAF[®] e confrontato con l'associazione ZELBORAF[®] più placebo. Il test **cobas** BRAF è stato utilizzato per determinare l'idoneità dei pazienti all'ammissione allo studio clinico. La sicurezza e l'efficacia dell'associazione COTELLIC[®] più ZELBORAF[®] sono state dimostrate tramite uno studio multicentrico, randomizzato (1:1), a doppio cieco, controllato con placebo, condotto su 495 pazienti affetti da melanoma non resecabile o metastatico positivo alla mutazione BRAF V600, che non erano stati trattati in precedenza. Il principale parametro di valutazione dell'efficacia è stata la sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS), in base alla valutazione degli sperimentatori secondo RECIST v1.1. Altri parametri di valutazione dell'efficacia sono stati il tasso di risposta obiettiva (objective response rate, ORR) confermato e valutato dagli sperimentatori, la sopravvivenza totale (OS), il PFS in base alla valutazione di un riesame centrale indipendente in cieco e la durata della risposta (duration of response, DOR).

Le caratteristiche dei livelli di partenza sono state bilanciate tra i gruppi di terapie. La maggioranza dei pazienti erano maschi (58%) e caucasici (93%), l'età mediana era 55 anni, lo stato delle prestazioni ECOG per il 72% dei pazienti era 0, il 60% dei pazienti era nello stadio M1c della malattia.

I campioni FFPE di tutti i pazienti presi in considerazione per la terapia sono stati analizzati con il test **cobas** BRAF. I pazienti con risultato del test "Mutation Detected" sono stati ritenuti idonei all'ammissione allo studio clinico se in possesso degli altri requisiti necessari. I pazienti con risultato "No Mutation Detected" sono stati ritenuti non idonei all'ammissione allo studio clinico. Allo studio

sono stati ammessi i pazienti con mutazioni BRAF V600K rilevate dal test **cobas** BRAF, per dimostrare la sicurezza e l'efficacia terapeutica del prodotto nella porzione identificata della popolazione dei pazienti affetti da tumori con mutazione V600K.

I risultati dell'efficacia della sperimentazione sono illustrati nella Tabella 17 e nella Figura 3:

Tabella 17
Efficacia del Cobimetinib in associazione con il vemurafenib in pazienti affetti da melanoma e positivi alla mutazione BRAF^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Placebo + Vemurafenib (N = 248)	Valore p
Sopravvivenza libera da progressione della malattia (in base alla valutazione dello sperimentatore)			
Numero di eventi (%)	143 (58%)	180 (73%)	
Progressione	131	169	
Decessi	12	11	
PFS mediana (mesi) (IC 95%)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Rapporto di rischio (IC 95%) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		<0,001 ^d
Sopravvivenza totale			
Numero di decessi (%)	79 (32%)	109 (44%)	
Sopravvivenza mediana (mesi) (IC 95%) ^c	Non valutabile (20,7, non valutabile)	17,0 (15,0, non valutabile)	-
Rapporto di rischio (IC 95%) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Tasso di risposta obiettiva			
Tasso di risposta obiettiva (IC 95%) ^c	70% (64%, 75%)	50% (44%, 56%)	< 0,001
Risposta completa	16%	10%	
Risposta parziale	54%	40%	
Durata mediana della risposta (mesi) (IC 95%) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a Come rilevato dal test **cobas** BRAF

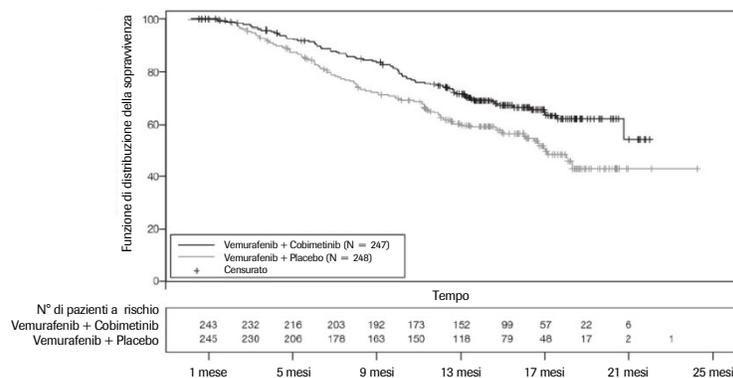
^b Rapporto di rischio stimato utilizzando il modello di Cox; un rapporto di rischio < 1 è favorevole all'associazione cobimetinib + vemurafenib

^c Stima di Kaplan-Meier

^d Test log-rank stratificato

^e Significatività statistica basata sul confronto con alfa assegnato di 0,019 per questa analisi intermedia

Figura 3
Curve di Kaplan-Meier della sopravvivenza totale



I campioni tumorali prelevati dai pazienti randomizzati sono stati analizzati retrospettivamente usando un sistema di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS) per classificare le mutazioni BRAF come V600E o V600K; per l'81% dei pazienti randomizzati (400 su 495) sono stati ottenuti risultati dal test. Tra i pazienti per i quali il sequenziamento NGS ha prodotto

risultati, 56 su 400 (ovvero il 14%) presentavano tumori con mutazioni BRAF V600K, mentre i pazienti restanti presentavano tumori con mutazioni BRAF V600E. I 56 tumori per i quali è stata individuata retrospettivamente la mutazione BRAF V600K presentavano frequenze della mutazione comprese tra il 5,1% e il 36,6% in questa analisi. Nelle analisi esplorative dei sottogruppi di PFS, OS e ORR per i sottotipi con mutazione BRAF V600, è stato osservato un trend favorevole al braccio cobimetinib + vemurafenib nell'81% dei pazienti di questo studio per i quali è stata identificata la mutazione BRAF V600.

II. CARCINOMA TIROIDEO PAPILLARE (PTC)

VALUTAZIONE DEL RENDIMENTO NON CLINICO

Per gli studi non clinici descritti sono state analizzate le caratteristiche del tumore. Ad esempio, il contenuto tumorale percentuale è stato valutato tramite un riesame patologico. Per la selezione dei campioni da analizzare è stato utilizzato il sequenziamento bidirezionale di Sanger. Il livello percentuale della mutazione è stato determinato attraverso il sequenziamento 454 (metodo quantitativo di pirosequenziamento massivamente parallelo).

Sensibilità analitica

Sensibilità analitica - limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD)

La quantità minima di DNA iniziale in grado di produrre risultati corretti nel 95% dei casi è stata valutata utilizzando pannelli di diluizione preparati con due tipi di campioni:

- Miscele di campioni preparate mescolando stock di DNA ottenuti da campioni FFPET contenenti la mutazione BRAF V600E e da campioni FFPET contenenti BRAF wild-type in modo da ottenere livelli di mutazione specifici.
- Stock di DNA FFPET individuali preparati con due campioni FFPET contenenti la mutazione BRAF V600E.

Tutti i campioni utilizzati in questo studio sono stati sottoposti a sequenziamento 454 al fine di determinare la mutazione percentuale di ogni campione.

Sensibilità analitica con le miscele di campioni

Gli stock di DNA campione FFPET con mutazione BRAF V600E sono stati miscelati con gli stock di DNA campione FFPET con BRAF wild-type in modo da ottenere un campione con livello di mutazione ~10%, un campione con livello di mutazione ~5% e un campione con livello di mutazione ~2%. Dopo la creazione della miscela, sono stati verificati i livelli di mutazione applicando il sequenziamento 454. Ognuna delle tre miscele di campioni contenenti la mutazione V600E è stata successivamente diluita in modo da ottenere i componenti del pannello descritti in dettaglio nella Tabella 18.

Tabella 18
Preparazione dei componenti del pannello di diluizione con le miscele di campioni

Miscela	Mutazione % media*	Quantità di DNA nei componenti del pannello di diluizione (ng/25 µl)**
Miscela, 10%	10%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Miscela, 5%	5%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Miscela, 2,5%	2%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0% (solo wild-type)	- - -	125

* Mutazione percentuale media della miscela, confermata dal sequenziamento 454.

** Quantità di DNA genomico contenuta in ogni componente del pannello. Il volume iniziale del campione da sottoporre al test è di 25 µl.

Sono state eseguite 8 repliche per ogni membro del pannello utilizzando ciascuno dei 3 lotti del kit del test **cobas** BRAF (n = 24/membro pannello). Nella Tabella 19 è indicata la sensibilità di ogni miscela FFPET, determinata in base alla quantità minima di DNA che ha prodotto una percentuale di almeno il 95% di risultati Mutation Detected relativamente alla mutazione BRAF V600E (righe ombreggiate).

Tabella 19
Sensibilità del test cobas BRAF con le miscele di campioni FFPET

Miscela FFPET	Mutazione percentuale in base al sequenziamento 454	Quantità di DNA nel componente del pannello	Percentuale "Mutation Detected" (n = 24)
Miscela FFPET, 10%	10%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	100%
		0,5 ng/25 µl	92%
		0,2 ng/25 µl	83%
		0,1 ng/25 µl	29%
Miscela FFPET, 5%	5%	125 ng/25 µl	96%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	100%
		1,5 ng/25 µl	83%
		0,5 ng/25 µl	54%
		0,2 ng/25 µl	67%
		0,1 ng/25 µl	25%
Miscela FFPET, 2,5%	2%	125 ng/25 µl	0%
		41,7 ng/25 µl	0%
		13,9 ng/25 µl	4%
		4,6 ng/25 µl	21%
		1,5 ng/25 µl	21%
		0,5 ng/25 µl	33%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%
0% (wild-type)	- - -	125 ng/25 µl	0%

Questo studio dimostra che il test **cobas** BRAF è in grado di rilevare la mutazione BRAF V600E con un livello di concentrazione $\geq 5\%$ utilizzando il volume iniziale raccomandato, pari a 125 ng/25 µl. La capacità del test di rilevare la mutazione quando il volume di DNA iniziale è più basso dimostra che la mutazione viene comunque rilevata, anche nel caso in cui i campioni contengano DNA degradato a causa del processo di fissazione. Il campione contenente BRAF wild-type ha generato tutti risultati "Mutation Not Detected".

Sensibilità analitica con i campioni FFPET

Per confermare che il test è in grado di rilevare la mutazione nei campioni dei pazienti a una concentrazione del 5%, sono stati utilizzati 3 lotti del kit per l'estrazione del DNA (**cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit) per analizzare 24 sezioni da 5 µm ottenute da due campioni FFPET con mutazione BRAF V600E contenenti livelli di mutazione del 6% e dell'11%. Da ogni sezione sono state preparate diluizioni seriali del DNA per realizzare un pannello con 8 componenti (Tabella 20).

Tabella 20
Preparazione dei componenti del pannello di diluizione con i campioni FFPET

	Mutazione V600E % media*	Quantità di DNA nei componenti del pannello di diluizione (ng/25 µl)
Campione 1	6%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Campione 2	11%	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* Mutazione percentuale media dei campioni determinata tramite sequenziamento 454

Sono state eseguite 8 repliche per ogni membro del pannello utilizzando ciascuno dei 3 lotti del kit del test **cobas** BRAF (n = 24/membro pannello). La sensibilità per ogni campione FFPE è stata determinata in base alla quantità più bassa di DNA ad aver prodotto almeno il 95% di risultati Mutation Detected per la mutazione BRAF V600E (righe ombreggiate). I risultati dello studio sono riportati nella Tabella 21.

Tabella 21
Sensibilità del test cobas BRAF con i campioni FFPE

Campioni FFPE	Mutazione percentuale in base al sequenziamento 454	Quantità di DNA nel componente del pannello	Percentuale "Mutation Detected" (n = 48)
Campione 1	6%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	83%
		1,5 ng/25 µl	71%
		0,5 ng/25 µl	29%
		0,2 ng/25 µl	17%
		0,1 ng/25 µl	0%
Campione 2	11%	125 ng/25 µl	100%
		41,7 ng/25 µl	100%
		13,9 ng/25 µl	100%
		4,6 ng/25 µl	71%
		1,5 ng/25 µl	46%
		0,5 ng/25 µl	17%
		0,2 ng/25 µl	13%
		0,1 ng/25 µl	8%

Questo studio ha dimostrato che il test **cobas** BRAF è in grado di rilevare la mutazione BRAF V600E nei campioni FFPE clinici veri e propri con un livello di mutazione $\geq 5\%$ utilizzando il volume iniziale raccomandato, pari a 125 ng/25 µl. La capacità del test di rilevare la mutazione quando il volume di DNA iniziale è più basso dimostra che la mutazione viene comunque rilevata, anche nel caso in cui i campioni contengano DNA degradato a causa del processo di fissazione.

Ripetibilità

Per valutare la ripetibilità del test **cobas** BRAF è stato condotto uno studio con due lotti di reagenti, due operatori in quattro giornate di lavoro, con cinque campioni FFPE di carcinoma tiroideo papillare. Questi campioni FFPE avevano un contenuto tumorale percentuale compreso tra il 50 e il 70% e un contenuto percentuale di alleli mutanti compreso tra il 16 e il 22%, inclusi due campioni con la mutazione V600E a una concentrazione di circa il 16-18% ($\sim 3 \times \text{LoD}$). Per il 100% dei campioni analizzati (80/80) sono stati ottenuti i risultati attesi. Non sono stati generati falsi positivi per nessuno dei campioni WT analizzati. In sintesi, è stata dimostrata l'elevata ripetibilità del test **cobas** BRAF sui campioni con contenuto tumorale basso e basse percentuali di alleli mutanti, tra più operatori, lotti di reagenti e giorni di lavoro.

Correlazione con un metodo di riferimento

Per valutare le prestazioni del test **cobas** BRAF rispetto al doppio sequenziamento bidirezionale di Sanger, sono stati raccolti i dati di sequenziamento di Sanger per 159 campioni FFPET di carcinoma tiroidale papillare. Nella Tabella 22 sono riportati i dati dell'analisi della concordanza primaria tra i risultati del test **cobas** BRAF e i risultati del sequenziamento di Sanger ai fini della rilevazione della mutazione V600E, con riferimento a uno dei due lotti di reagenti analizzati. Il secondo lotto ha prodotto risultati simili, ad eccezione di un campione che ha generato un risultato "Mutation Not Detected". La risoluzione tramite sequenziamento 454 ha determinato che il campione conteneva un livello di mutazione dell'1,4% ed era al di sotto del livello di sensibilità del 5% dichiarato per il test **cobas** BRAF.

Tabella 22
Riepilogo dei risultati del test cobas BRAF rispetto ai risultati del sequenziamento di Sanger

cobas BRAF Test (metodo di analisi)	Sequenziamento di Sanger (metodo di riferimento)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	Totale
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Totale	89	70	159
Concordanza percentuale positiva (IC 95%)	100% × 88/89 = 98,9% (93,9%, 99,8%)		
Concordanza percentuale negativa (IC 95%)	100% × 57/70 = 81,4% (70,8%, 88,8%)		
Concordanza percentuale totale (IC 95%)	100% × 145/159 = 91,2% (85,8%, 94,7%)		

^a I risultato "Mutation Detected" indica la presenza del tipo di mutazione BRAF predominante, V600E (1799 T>A), identificato con il metodo di Sanger.

^b I risultato "Mutation Not Detected" indica l'assenza del tipo di mutazione BRAF predominante (V600E) identificato con il metodo di Sanger (ovvero wild-type o nessuna mutazione, o altre mutazioni).

Nota: IC = intervallo di confidenza (percentuale).

Tutti i campioni che hanno generato risultati discordanti tra il test **cobas** BRAF e il sequenziamento di Sanger sono stati sottoposti al sequenziamento 454 (pirosequenziamento quantitativo massivamente parallelo) come secondo metodo di riferimento. Nella Tabella 23 sono riportati i risultati dell'analisi della concordanza secondaria dopo la risoluzione della discordanza.

Un campione discordante aveva generato un risultato "Mutation Not Detected" con il test **cobas** BRAF e un risultato V600E in base al sequenziamento di Sanger. Il sequenziamento 454 ha fornito un risultato wild-type in concordanza con il test **cobas** BRAF.

Per dodici dei tredici campioni discordanti che il test **cobas** BRAF aveva classificato come mutanti mentre il sequenziamento di Sanger aveva classificato come wild-type, il sequenziamento 454 ha rilevato una mutazione V600E (frequenza dell'allele tra l'1,2% e il 19%), concordemente con il test **cobas** BRAF.

Il solo campione discordante restante, per il quale il test **cobas** BRAF aveva rilevato una mutazione V600E, è stato identificato come wild-type sia dal sequenziamento di Sanger, sia dal sequenziamento 454. Una successiva indagine effettuata con il metodo di sequenziamento 454 ha confermato che il campione aveva una percentuale di mutante V600E bassa.

Tabella 23
Risultati del test cobas BRAF rispetto al sequenziamento di Sanger dopo la risoluzione della discordanza mediante sequenziamento 454

cobas BRAF Test (metodo di analisi)	Sequenziamento di Sanger dopo la risoluzione della discordanza mediante il sequenziamento 454		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Totale
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Totale	101	58	159
Concordanza percentuale positiva (IC 95%)	100% × 101/101 = 100,0% (96,3%, 100,0%)		
Concordanza percentuale negativa (IC 95%)	100% × 57/58 = 98,3% (90,9%, 99,7%)		
Concordanza percentuale totale (IC 95%)	100% × 158/159 = 99,4% (96,5%, 99,9%)		

ELENCO DEI FLAG DEI RISULTATI

I flag dei risultati sono visualizzati nella scheda Results. L'origine di un flag è rivelata dal codice, come illustrato di seguito (Tabella 24). Nella Tabella 25 sono elencati i flag ritenuti importanti per l'utente ai fini dell'interpretazione dei risultati.

Tabella 24
Origine del flag

Il codice inizia per	Origine del flag	Esempio
M*	Motivi vari o altri	M6
R	Interpretazione del risultato	R200
Z*	Analizzatore	Z1

* Fare riferimento al Manuale Operativo del **cobas**[®] 4800 System o all'Assistenza Utente del **cobas**[®] 4800

Tabella 25
Elenco dei flag per l'interpretazione dei risultati

Codice flag	Livello di gravità	Descrizione	Azione consigliata
R200	Errore	Controllo mutante non valido.	Ripetere la seduta. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico. Questo codice flag indica che: <ol style="list-style-type: none">1. Un valore gomito osservato per il controllo mutante era al di sotto della soglia fissata (gomito troppo basso). La causa potrebbe essere la contaminazione del DNA o un errore dell'algoritmo dovuto a un pattern di fluorescenza atipico, oppure2. Un valore gomito osservato per il controllo mutante era al di sopra della soglia fissata (gomito troppo alto). La causa potrebbe essere: 1) preparazione errata della soluzione di lavoro Master Mix; 2) errore di pipettamento della soluzione di lavoro Master Mix mentre veniva aggiunta in uno dei pozzetti della micropietra; oppure 3) errore di pipettamento del controllo mutante mentre veniva aggiunto in uno dei pozzetti della micropietra.
R201	Errore	Controllo wild-type non valido.	Ripetere la seduta. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico. Questo codice flag indica che: <ol style="list-style-type: none">1. Un valore gomito osservato per il controllo wild-type era al di sotto della soglia fissata (gomito troppo basso). La causa potrebbe essere la contaminazione del DNA o un errore dell'algoritmo dovuto a un pattern di fluorescenza atipico, oppure2. Un valore gomito osservato per il controllo wild-type era al di sopra della soglia fissata (gomito troppo alto). La causa potrebbe essere: 1) preparazione errata della soluzione di lavoro Master Mix; 2) errore di pipettamento della soluzione di lavoro Master Mix mentre veniva aggiunta in uno dei pozzetti della micropietra; oppure 3) errore di pipettamento del controllo wild-type mentre veniva aggiunto in uno dei pozzetti della micropietra.
R202	Errore	Ct mutante non rilevato	Ripetere il campione. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico. Questo codice del flag segnala che non è stato rilevato un valore gomito mutante per il campione. Ciò potrebbe indicare che la mutazione non è presente nel campione oppure una o alcune condizioni tra le seguenti: <ol style="list-style-type: none">1. Bassa percentuale di sequenze mutanti, al di sotto del limite di sensibilità del test.2. Scarsa qualità del DNA genomico ottenuto dal campione.3. Trattamento inadeguato del campione.4. Presenza di inibitori della PCR nel campione.5. Presenza di mutazioni rare nelle regioni del DNA genomico coperte dai primer e/o dalla sonda mutante.6. Errore di pipettamento del campione, oppure mancata aggiunta del DNA campione nel pozzetto della reazione.

Codice flag	Livello di gravità	Descrizione	Azione consigliata
R203	Errore	Ct wild-type non rilevato.	<p>Ripetere il campione. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico.</p> <p>Questo codice del flag segnala che non è stato rilevato un valore gomito wild-type per il campione. L'assenza di un valore gomito wild-type è indicativa di una o alcune condizioni tra le seguenti:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Scarsa qualità del DNA genomico ottenuto dal campione. 2. Trattamento inadeguato del campione. 3. Presenza di inibitori della PCR nel campione. 4. Presenza di mutazioni rare nelle regioni del DNA genomico coperte dai primer e/o dalla sonda wild-type. 5. La mancata aggiunta del DNA campione in uno o più pozzetti.
R204	Errore	Ct mutante fuori range.	<p>Ripetere il campione. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico.</p> <p>Questo codice flag indica che:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Un valore gomito mutante osservato per il campione era al di sotto della soglia fissata (gomito troppo basso). La causa potrebbe essere una miscela della PCR particolarmente sovraccarica di DNA genomico concentrato o un errore dell'algoritmo dovuto a un pattern di fluorescenza atipico, oppure 2. Un valore gomito mutante osservato per il campione era al di sopra della soglia fissata (gomito troppo alto). Ciò potrebbe indicare una o alcune condizioni tra le seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • Bassa percentuale di sequenze mutanti, al di sotto del limite di sensibilità del test. • Errore di pipettamento durante l'aggiunta del DNA campione nel pozzetto della reazione. • Scarsa qualità del DNA genomico ottenuto dal campione. • Trattamento inadeguato del campione. • Presenza di inibitori della PCR nel campione. • Presenza di mutazioni rare nelle regioni del DNA genomico coperte dai primer e/o dalla sonda mutante.
R205	Errore	Ct wild-type fuori range.	<p>Ripetere il campione. Consultare le istruzioni per l'uso del test specifico.</p> <p>Questo codice flag indica che:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Un valore gomito wild-type osservato per il campione era al di sotto della soglia fissata (gomito troppo basso). La causa potrebbe essere una miscela della PCR particolarmente sovraccarica di DNA genomico concentrato o un errore dell'algoritmo dovuto a un pattern di fluorescenza atipico, oppure 2. Un valore gomito wild-type osservato per il campione era al di sopra della soglia fissata (gomito troppo alto). Ciò potrebbe indicare una o alcune condizioni tra le seguenti: <ul style="list-style-type: none"> • Errore di pipettamento durante l'aggiunta del DNA campione nel pozzetto della reazione. • Scarsa qualità del DNA genomico ottenuto dal campione. • Trattamento inadeguato del campione. • Presenza di inibitori della PCR nel campione. • Presenza di mutazioni rare nelle regioni del DNA genomico coperte dai primer e/o dalla sonda wild-type.

BIBLIOGRAFIA

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

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 10.0 08/2019	<p>Aggiornamento delle sezioni USO PREVISTO e RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST aggiornate.</p> <p>Inserimento delle sezioni Efficacia clinica del ZELBORAF® (vemurafenib) e Efficacia clinica del COTELLIC® (cobimetinib).</p> <p>Aggiunta di informazioni sulla stabilità dei vetrini nella sezione PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.</p> <p>Aggiunta della dichiarazione sulla melanina nella sezione LIMITI DELLA PROCEDURA.</p> <p>Aggiunta di aggiornamenti per chiarire e uniformare il contenuto relativo al test cobas® 4800 per la mutazione BRAF V600 (US-IVD IFU).</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>
11/2019	<p>Correzione della sigla “FFPET” in “FFPET” e del font del simbolo “maggiore o uguale a” a pagina 24, per una migliore resa in PDF.</p> <p>Aggiornata la pagina dei simboli armonizzati.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>
Doc Rev. 11.0 06/2020	<p>Rimosse le seguenti informazioni sul DNA Sample Preparation Kit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Elenchi di reagenti e composizione • Note procedurali correlate <p>Aggiunta del riferimento al cobas® DNA Sample Preparation Kit e alle Istruzioni per l'uso, all'inizio e nella sezione “Limiti della procedura”.</p> <p>Aggiornamento generale dei riferimenti al Manuale del sistema e al Manuale Operativo, cambiati in “Manuale Operativo del cobas® 4800 System o Assistenza Utente del cobas® 4800 System”.</p> <p>Correzione di refusi e aggiornamento del testo per uniformità e coerenza del lessico in base agli standard per le istruzioni per l'uso negli Stati Uniti.</p> <p>Aggiunta dei flag dei risultati.</p> <p>Aggiornamento del riferimento alla International Air Transport Association.</p> <p>Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati, della sezione dei marchi e dei brevetti e degli indirizzi dei distributori.</p> <p>Aggiunta di una dichiarazione di conformità dell'etichettatura di sicurezza del prodotto in base alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>

Fabbricato negli USA



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

Marchi e brevetti

COBAS, COBAS Z e AMPERASE sono marchi di Roche.

Tutti gli altri nomi di prodotti e marchi appartengono ai rispettivi proprietari.

La tecnologia per la prevenzione del carryover nell'enzima AmpErase è protetta dal Brevetto USA n. 7,687,247 di proprietà di Life Technologies, concesso in licenza a Roche Molecular Systems, Inc.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-11



I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

	Software ausiliario		Codice del batch
	Mandatario nella Comunità Europea		Rischio biologico
	Foglio di dati del barcode		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Solo per valutazione delle prestazioni IVD
	Contenuto sufficiente per $\langle n \rangle$ test		Limite inferiore dell'intervallo assegnato
	Contenuto del kit		Fabbricante
	Distribuito da		Conservare al buio
	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Limiti di temperatura
	File di definizione del test		Utilizzare entro la data
	Limite superiore dell'intervallo assegnato	Rx Only	Solo USA: la legge federale degli Stati Uniti limita la vendita di questo dispositivo a personale medico abilitato o provvisto di prescrizione medica.
	Global Trade Item Number		Data di produzione
	Dichiarazione di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti di marcatura CE per i dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i> .		

Assistenza Tecnica ai clienti USA 1-800-526-1247