

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

cobas®

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Informace o přípravě vzorku najdete v soupravě **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

ÚČEL POUŽITÍ

Primární použití testu mutace V600 genu BRAF na zařízení **cobas®** 4800 je detekce mutací V600 genu BRAF v DNA, extrahovaných z lidských kožních melanomů a papilárních karcinomů štítné žlázy (PTC) fixovaných ve formalínu a archivovaných v parafinových blocích. U melanomů je test určen jako pomůcka pro výběr pacientů, jejichž nádory obsahují mutace genu BRAF V600, pro léčbu samotným přípravkem ZELBORAF® (vemurafenib) nebo přípravkem COTELLIC® (cobimetinib) v kombinaci s přípravkem ZELBORAF® (vemurafenib).

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Aktivující mutace protoonkogenu BRAF se objevují u mnoha lidských karcinomů včetně maligního melanomu, kolorektálního karcinomu, karcinomu vaječníků a karcinomu štítné žlázy.^{1, 2} Mutace genu BRAF byly detekovány u 40–60 % maligních melanomů³ a 36–46 % papilárních karcinomů štítné žlázy.^{4, 5} Mutace genu BRAF se běžně vyskytují u benigních mateřských znamének,⁶ což poukazuje na to, že k těmto mutacím dochází velice časně. Objevení těchto somatických mutací genu BRAF v melanomu, PTC a jiných lidských nádorech pomohlo objasnit ústřední roli kinázy BRAF v signálních drahách, které řídí buněčný růst, diferenciaci a zánik buněk. U zdravých buněk je BRAF součástí vysoce regulované signální dráhy, jež zprostředkovává účinky receptorů pro růstový faktor (jako je EGFR) pomocí RAS, RAF, MEK a ERK. Onkogenické mutace genu BRAF mají za následek aktivaci kinázy, což vede k nadměrné aktivaci dráhy RAF-MEK-ERK při nepřítomnosti typických růstových faktorů.

Většina mutací genu BRAF v melanomech, PTC a jiných lidských nádorech se objevuje v kodonu 600.⁷ Predominantní mutace v kodonu 600 je mutace V600E (GTG > GAG). Méně často bylo pozorováno množství dinukleotidových mutací postihujících kodon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) a V600D (GTG > GAT)] primárně u melanomů a zřídka u jiných nádorů, jako je kolorektální karcinom.

Test mutace V600 genu BRAF na systému **cobas®** 4800 je založen na principu PCR v reálném čase a je určený ke zjišťování mutace V600E (T1799A). Test mutace V600 genu BRAF na systému **cobas®** 4800 se používá jako pomocný diagnostický pro vemurafenib, látku, která inhibuje mutaci V600E genu BRAF. Při klinických hodnoceních vemurafenibu u pacientů s pokročilým melanomem se ukázalo, že tato látka má pravděpodobně klinický přínos u pacientů s nádorem s mutací V600E.^{8, 9} Následně se v klinickém hodnocení přípravku cobimetinib v kombinaci s vemurafenibem u pacientů s pokročilým melanomem ukázalo, že pacienti s nádorem vykazujícím mutaci V600E nebo V600K, které jsou detekované pomocí testu V600 genu BRAF na systému **cobas®** 4800 budou mít z této léčby pravděpodobně klinický přínos.^{10, 11} Mutace V600K je přítomna u přibližně 10–15 % vzorků melanomu s mutacemi V600 genu BRAF.¹²

PRINCIPY POSTUPU

Test mutace V600 genu BRAF na systému **cobas®** 4800 (test **cobas** BRAF) je založen na dvou procesech: (1) manuální příprava vzorku za účelem získání genomické DNA z tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafinových blocích (FFPET); (2) PCR amplifikace a detekce cílové DNA pomocí komplementárního páru primerů a dvou oligonukleotidových sond značených různými fluorescenčními barvami. Jedna sonda detekuje sekvenci V600 genu BRAF divokého typu a druhá detekuje zmutovanou sekvenci V600E. Dodávány jsou dvě externí kontroly cyklu a alela divokého typu slouží jako interní kontrola zpracování.

Příprava vzorku

Pomocí soupravy **cobas®** DNA Sample Preparation Kit, která slouží k manuální přípravě vzorků založené na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna, se zpracují vzorky FFPET a izoluje se genomická DNA. 5µm řez FFPET vzorku zbavený parafinu je rozštěpen inkubací při zvýšené teplotě pomocí proteázy a chaotropního lytického/vazebného pufru, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou genomickou DNA před působením DNáz. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s filtrační vložkou ze skelného vlákna. Při centrifugaci se genomická DNA naváže na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Adsorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a poté eluovány vodným roztokem. Množství genomické DNA je měřeno spektrofotometriky a upraveno na určenou koncentraci pro přidání k amplifikační a detekční směsi. V analyzátoru **cobas** z 480 je amplifikována a detekována cílová DNA pomocí amplifikačních a detekčních činidel dodávaných v soupravě testu **cobas** BRAF.

Amplifikace a detekce pomocí PCR

Volba cílové sekvence

Test **cobas** BRAF využívá primery, které definují sekvenci se 116 páry bází lidské genomické DNA obsahující oblast kodonu 600 genu BRAF v exonu 15. Celý gen BRAF amplifikován není. Test **cobas** BRAF detekuje změnu nukleotidu 1799 T>A genu BRAF, což má za následek substituci valinu za kyselinu glutámovou v kodonu 600 (V600E). Fluorescenční značené sondy TaqMan specifické pro gen BRAF divokého typu se vážou na sekvence divokého typu a fluorescenční značené sondy TaqMan specifické pro mutantní DNA se vážou na mutantní sekvence. Sekvence divokého typu a mutantní sekvence jsou detekovány optickými kanály přiřazenými pro každou sekvenci.

Amplifikace cíle

Pro amplifikaci cíle se používá Z05 DNA polymeráza druh Thermus. Nejdříve se PCR reakční směs zahřeje za účelem denaturace genomické DNA a tím se odhalí cílové sekvence pro primer. Během ochlazování směsi dochází k anelaci upstream a downstream primerů k sekvencím cílové DNA. Z05 DNA polymeráza za přítomnosti dvojmocných kovových iontů a nadbytku dNTP každý anelovaný primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii cílové oblasti 116 párů bází genu BRAF. Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se efektivně zdvojnásobuje množství amplikonové DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genu BRAF mezi primery.

Automatická detekce v reálném čase

Test **cobas** BRAF využívá technologii PCR v reálném čase. Každá cílově specifická oligonukleotidová sonda v reakci je označena fluorescenčním barvivem, které slouží jako oznamovací, a další tlumicí molekulou, která absorbuje a tlumí fluorescenční emise z oznamovacího barviva v intaktní sondě. Během každého cyklu amplifikace se sonda komplementární k jednovláknové DNA sekvenci v amplikonu váže a následně je rozštěpena 5' až 3' nukleázovou aktivitou Z05 DNA polymerázy. Jakmile je pomocí této nukleázové aktivity separováno oznamovací barvivo od tlumicího barviva, je možné po excitaci oznamovacího barviva příslušným světelným spektrem měřit fluorescenční signál o specifické vlnové délce. Pro označení sondy pro cílově specifický gen BRAF divokého typu (WT) a sondy pro mutaci V600E BRAF se používají dvě různá oznamovací barviva. Amplifikaci těchto dvou sekvencí BRAF je možné detekovat samostatně v jedné reakční jamce pomocí měření fluorescenčního signálu o dvou specifických vlnových délkách v dedikovaných optických kanálech.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny vzorku je v testu **cobas** BRAF dosažena použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP).¹³ Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje destrukci vláken DNA obsahujících deoxyuridin, ale vynechává DNA obsahující thymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití dUTP jako jednoho z nukleotid trifosfátu v činidle Reaction Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Reaction Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55 °C, to je během fází tepelného cyklu, neaktivní, a proto terčový amplikon nerozkládá.

ČINIDLA

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 testů (M/N: 05985595190)			
Součásti soupravy	Složky činidel	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování ^a
RXNMIX (Reakční směs)	Tricinový pufr Octan draselný Hydroxid draselný Glycerol Tween 20 EDTA 5 % dimetylsulfoxid < 0,09 % dNTPs < 0,10 % Z05 DNA polymeráza (mikrobiální) < 0,10 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální) < 0,003 % oligonukleotidový aptamer 0,08 % azid sodný	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (Octan hořečnatý)	Octan hořečnatý 0,09 % azid sodný	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (BRAF Oligo směs)	Pufr Tris-HCl EDTA 0,09 % azid sodný Poly rA RNA (syntetická) < 0,01 % upstream a downstream BRAF primery < 0,01 % fluorescenčně značené sondy BRAF	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (Kontrola mutace BRAF)	Pufr Tris-HCl EDTA Poly rA RNA (syntetická) 0,05 % azid sodný < 0,001 % plazmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence mutace BRAF < 0,001 % plazmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence BRAF divokého typu	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (Kontrola BRAF divokého typu)	Pufr Tris-HCl EDTA Poly rA RNA (syntetická) 0,05 % azid sodný < 0,001 % plazmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence BRAF divokého typu	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (Roztok pro ředění vzorků DNA)	Pufr Tris-HCl 0,09 % azid sodný	2 × 1 ml	N/A

^a Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test se používá pro vzorky tkáně fixované ve formalínu a archivované v parafinových blocích.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- E. Zamezte mikrobiální a DNA kontaminaci činidel.
- F. Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- G. Nepoužívejte soupravy po uplynutí data použitelnosti.
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav nebo šarží.
- I. Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- J. Je nutné nosit rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměnit mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly pro **cobas® 4800**.
- K. Aby nedošlo ke kontaminaci pracovního Master mixu vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou Master mixu pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipetory řádně otřít 0,5% roztokem chlornanu sodného* a poté otřít 70% roztokem etanolu.
*** POZN.: běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.**
- L. Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními za použití bezpečných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ a dokumentu CLSI M29-A4.¹⁵
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT a DNA SD** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olovným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- N. Při práci s jakýmkoliv činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozliti, zředte je před vytřením dosucha vodou.
- O. Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Nepoužívat opakovaně.
- P. Položky k jednorázovému použití nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Q. Pro čištění analyzátoru **cobas z 480** nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Vyčistěte analyzátor **cobas z 480** podle postupů popsanych v Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- R. Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace analyzátoru **cobas z 480** najdete v návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo v Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- S. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety bez DNázy.

POŽADAVKY NA UCHOVÁVÁNÍ A MANIPULACI

- A. Činidla nezmrazujte.
- B. **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT a DNA SD** uchovávejte při 2–8 °C. Po otevření jsou tato činidla stabilní až 4 použití po dobu 60 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- C. **BRAF OM** a pracovní Master Mix (připravený přidáním **BRAF OM** a **MGAC** do **RXNMIX**) musí být chráněny před delším vystavením světlu.
- D. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **BRAF OM** a **MGAC** do **RXNMIX**) je nutné uchovávat při teplotě 2–8 °C ve tmě. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 1 hodiny od přípravy pracovního Master Mix.
- E. Zpracované vzorky (extrahovaná DNA) jsou stabilní maximálně 24 hodin při teplotě 15 °C až 30 °C, až 14 dní při teplotě 2 °C až 8 °C nebo až 60 dní při –15 °C až –25 °C nebo do provedení 3 cyklů zmrazení/rozmrazení při uchovávání při teplotě –15 °C až –25 °C. Extrahovanou DNA je nutné amplifikovat během doporučené doby uchovávání nebo před datem expirace soupravy **cobas® DNA Sample Preparation Kit** použité pro extrakci DNA, je-li tato doba kratší.
- F. Amplifikace musí začít do 1 hodiny od přidání zpracovaných vzorků a kontrol do pracovního Master Mixu (připraveného přidáním **BRAF OM** a **MGAC** do **RXNMIX**).

DODÁVANÝ MATERIÁL

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

BRAF

24 testů

RXNMIX

(Reakční směs) (Víčko s bezbarvým tlačítkem)

MGAC

(Octan hořečnatý) (Víčko se žlutým tlačítkem)

BRAF OM

(BRAF Oligo směs) (Černé víčko s bílým tlačítkem)

BRAF MUT

(Kontrola mutace BRAF) (Víčko s červeným tlačítkem)

BRAF WT

(Kontrola BRAF divokého typu) (Víčko s modrým tlačítkem)

DNA SD

(Roztok pro ředění vzorků DNA) (Víčko s purpurovým tlačítkem)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190)
- Mikrotitrační destička (AD-destička) a zalepovací fólie pro systém **cobas®** 4800 (Roche M/N: 05232724001)
- Nastavitelné pipetory*: (objem 10 µl, 20 µl, 200 µl a 1000 µl) s aerosolovou bariérou nebo špičky s přímým vypuzováním bez DNázy
- Zkumavky do mikrocentrifugy s víčkem s pojistkou (1,5ml sterilní, bez RNázy/DNázy, pro PCR) (od kteréhokoli dodavatele)
- Spektrofotometr pro měření koncentrace DNA**
- Vířivý mixér (Vortex)**
- Stojany na zkumavky do mikrocentrifugy
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Mraznička umožňující dosahovat teplot $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

* *Pipetory je nutné udržovat podle pokynů výrobce a musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s přímým vypuzováním bez DNázy, aby se zabránilo degradaci vzorku a vzájemné kontaminaci.*

** *Veškeré vybavení je nutné řádně udržovat podle pokynů výrobce.*

Vybavení a software

- Analyzátor **cobas** z 480
- Řídicí jednotka systému **cobas®** 4800 SR2 s Windows XP
- Software systému **cobas®** 4800 SR2 verze 2.0 nebo vyšší
- Softwarový balíček pro analýzu BRAF verze 1.0 nebo vyšší
- Čtečka čárových kódů (Roche M/N 05339910001)
- Tiskárna HP P2055d (Roche M/N 05704375001)

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

POZN.: se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.

A. Odběr vzorků

Vzorky FFPET byly validovány pro použití s testem **cobas** BRAF.

B. Přeprava vzorků

Vzorky FFPET přepravovat při teplotě 15 až 30 °C. Při přepravě vzorků FFPET je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu infekčních biologických materiálů.¹⁶

C. Skladování vzorků

Byla potvrzena stabilita vzorků FFPET uchovávaných při teplotě 15–30 °C po dobu až 12 měsíců od data odebrání. 5µm řezy FFPET na sklíčkách je možné uchovávat při teplotách 15–30 °C až 60 dnů.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: všechna činidla, kromě RXNMIX, MGAC a BRAF OM, musí mít před použitím teplotu okolí. RXN MIX, MGAC a BRAF OM je možné vyjmout přímo z teploty 2–8 °C před přípravou pracovního Master Mixu.

POZN.: v testu cobas BRAF se používají pouze FFPE řezy melanomu a PTC o tloušťce 5 µm, které obsahují alespoň 50 % nádorových buněk. U vzorků, které obsahují méně než 50 % nádorových buněk, je nutné po deparafinizaci provést makrodisekci.

POZN.: viz příručka obsluhy pro systém cobas® 4800 nebo Asistent uživatele systému cobas® 4800, kde najdete podrobné postupy pro analyzátor cobas z 480.

Velikost cyklu

Souprava testu cobas BRAF je určena pro zpracování minimálně 3 vzorků plus kontroly a maximálně pro 24 vzorků plus kontroly. Je možné najednou zpracovat méně než 3 vzorky plus kontroly, ale může to mít za následek nedostatečný objem činidel pro zpracování, celkem 24 vzorků plus kontroly danou soupravou. Test cobas BRAF obsahuje množství činidel dostatečné pro 8 cyklů se 3 vzorky plus kontrolami. K provedení každého cyklu je zapotřebí jeden replikát kontroly mutace testu cobas BRAF [BRAF MUT] a jeden replikát kontroly divokého typu testu cobas BRAF [BRAF WT] (viz část „Kontrola kvality“).

Pracovní postup

POZN.: test cobas BRAF je možné použít pro cyklus až se 24 vzorky.

POZN.: aby byla činidla maximálně využita, testovací cyklus by měl zahrnovat alespoň tři (3) vzorky od pacientů plus kontroly.

Izolace DNA

Pomocí cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) (Souprava pro přípravu vzorků DNA) je DNA izolována ze vzorků FFPE.

Makrodisekce

Jestliže vzorek podle plochy obsahuje méně než 50 % nádoru, musí být provedena makrodisekce vzorku jako součást přípravy vzorku.

Kvantifikace DNA

POZN.: měření koncentrace DNA je nutné provést před uchováváním okamžitě po izolaci DNA.

- A. Před kvantifikací každou zásobní DNA míchejte vířením po dobu 5 sekund.
- B. Spektrofotometrem kvantifikujte DNA podle protokolu výrobce. Jako slepý vzorek pro zařízení použijte DNA EB dodávaný v soupravě cobas® DNA Sample Preparation Kit. Průměrně jsou nutná 2 konzistentní měření. Když budou hodnoty koncentrace DNA $\geq 20,0$ ng/µl, tato dvě měření by se měla vzájemně lišit o ± 10 % hodnoty. Při koncentraci DNA $< 20,0$ ng/µl musí být tato dvě měření v rozmezí $\pm 2,0$ ng/µl.
- C. Koncentrace zásobní DNA musí být ≥ 5 ng/µl, aby bylo možné provést test cobas BRAF.

POZN.: aby bylo možné provést test cobas BRAF, každá zásobní DNA musí mít minimální koncentraci 5 ng/µl. Pokud je koncentrace zásobní DNA < 5 ng/µl, je nutné deparafinizaci, izolaci DNA a kvantifikaci DNA pro tento vzorek opakovat s použitím dvou 5µm FFPE řezů. U vzorků na sklíčkách po deparafinizaci smíchejte tkáň z obou řezů do jedné zkumavky, ponořte tkáň do TLB a PK ze soupravy cobas® DNA Sample Preparation Kit a proveďte izolaci a kvantifikaci DNA. U vzorků bez sklíček smíchejte tkáň z obou řezů do jedné zkumavky a proveďte deparafinizaci, izolaci a kvantifikaci DNA. Pokud je koncentrace zásobní DNA stále < 5 ng/µl, vyžádejte si další řez vzorku FFPE z dodávacího klinického pracoviště.

POZN.: zpracované vzorky (extrahovaná DNA) jsou stabilní maximálně 24 hodiny při teplotě 15 °C až 30 °C, až 14 dní při teplotě 2 °C až 8 °C nebo až 60 dní při –15 °C až –25 °C nebo do provedení 3 cyklů zmrazení/rozmrazení při uchovávání při teplotě –15 °C až –25 °C. Extrahovanou DNA je nutné amplifikovat během doporučené doby uchovávání nebo před datem expirace soupravy cobas® DNA Sample Preparation Kit použité pro extrakci DNA, je-li tato doba kratší.

AMPLIFIKACE A DETEKCE

POZN.: aby nedošlo ke kontaminaci pracovního Master mixu vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou Master mixu pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipetory řádně otřít 0,5% roztokem chlornanu sodného a poté otřít 70% roztokem etanolu. Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

Nastavení přístroje

Viz Příručka obsluhy pro systém **cobas**® 4800 nebo Asistent uživatele systému **cobas**® 4800, kde najdete podrobné postupy pro nastavení analyzátoru **cobas** z 480.

Nastavení objednávky testu

Podrobné pokyny ke krokům pracovního postupu testu **cobas** BRAF naleznete v Návodu k použití systému **cobas**® 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas**® 4800.

Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku:

s každým vzorkem se provádí jen jedna amplifikace/detekce pomocí 25 µl zásobní DNA naředěné na 5 ng/µl (celkem 125 ng). Pokyny níže uvádějí přípravu minimálního objemu 35 µl naředěné zásobní DNA na 5 ng/µl v závislosti na koncentraci původní zásobní DNA. Tímto se zajistí, že každý vzorek použije alespoň 5 µl zásobní DNA a zabrání tak variaci, ke které by mohlo dojít při pipetování menších objemů vzorku.

Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku při koncentracích od 5 ng/µl do 35 ng/µl

POZN.: zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

POZN.: s každým vzorkem se provádí jen jedna amplifikace/detekce pomocí 25 µl zásobní DNA naředěné na 5 ng/µl (celkem 125 ng).

- A. Pomocí následujícího vzorce stanovte množství požadované zásobní DNA pro každý vzorek:
Objem požadované zásobní DNA = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div \text{koncentrace zásobní DNA v ng/µl}$
- B. Pomocí následujícího vzorce stanovte množství požadovaného roztoku k ředění DNA vzorku (**DNA SD**) pro každý vzorek:
Objem požadovaného DNA SD v µl = $(35 \text{ µl} - \text{objem požadované zásobní DNA v µl})$
- Příklad:
Koncentrace zásobní DNA = 21 ng/µl
- A. Objem požadované zásobní DNA = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$
- B. Objem požadovaného DNA SD v µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku při koncentracích > 35 ng/µl

POZN.: zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

POZN.: s každým vzorkem se provádí jen jedna amplifikace/detekce pomocí 25 µl zásobní DNA naředěné na 5 ng/µl (celkem 125 ng).

- A. Při koncentraci zásobní DNA > 35 ng/µl používejte následující vzorec pro výpočet množství roztoku pro ředění DNA vzorků (**DNA SD**) požadovaného k přípravě alespoň 35 µl zředěné zásobní DNA. Díky tomu každý vzorek použije minimálně 5 µl zásobní DNA.
Objem potřebného DNA SD v µl = $[(5 \text{ µl} \times \text{konc. zásobní DNA v ng/µl}) \div (5 \text{ ng/µl})] - 5 \text{ µl}$
- B. Použijte vypočtený objem **DNA SD** k ředění 5 µl zásobní DNA.
- Příklad:
Koncentrace zásobní DNA = 42 ng/µl
- A. Objem požadovaného DNA SD v µl = $[(5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$
- B. Použijte vypočtený objem **DNA SD** k ředění 5 µl zásobní DNA.

Ředění vzorků

- A. Připravte si příslušné množství 1,5ml zkumavek pro mikrocentrifugu pro ředění zásobní DNA ze vzorků a označte je příslušnou identifikací vzorku v části pro přidání vzorku.
- B. Pomocí pipetoru se špičkou bránící vzniku aerosolů napipetujte vypočtený objem roztoku pro ředění DNA vzorků (**DNA SD**) do každé označené zkumavky.
- C. Každou zásobní DNA ze vzorku míchejte vířením po dobu 10 sekund.
- D. Pomocí pipetoru se špičkou bránící vzniku aerosolu opatrně napipetujte vypočtený objem každé zásobní DNA ze vzorku do příslušně označených zkumavek obsahujících **DNA SD**. Na každý vzorek přitom použijte novou špičku.
- E. Každou naředěnou zásobní DNA ze vzorku uzavřete víčkem a míchejte vířením 10 sekund.
- F. Vyměňte rukavice.

Příprava pracovního Master Mix (MMX)

POZN.: BRAF Oligo Mix a pracovní MMX jsou citlivé na světlo. Všechny směsi BRAF OM a pracovního MMX je nutné chránit před dlouhodobým působením světla.

- A. Vypočtete objem potřebného **RXNMIX** pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **RXNMIX** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1) × 10 µl
- B. Vypočtete objem potřebného **BRAF OM** pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **BRAF OM** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1) × 8 µl
- C. Vypočtete objem potřebného **MGAC** pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **MGAC** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1) × 7 µl
- Tab. 1 můžete použít ke stanovení objemu každého činidla potřebného pro přípravu pracovního MMX za základě počtu vzorků v cyklu.

Tab. 1

Objem činidel potřebný pro pracovní MMX											
Počet vzorků*											
		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
Celkový objem (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Počet vzorků + 2 kontroly + 1

- D. Vyjměte příslušný počet lahvíček **RXNMIX**, **BRAF OM** a **MGAC** z místa skladování o teplotě 2–8 °C. Před použitím každé činidlo míchejte 5 sekund vířením, a shromážděte kapalinu ve spodní části zkumavky. Označte sterilní zkumavku pro mikrocentrifugu pro pracovní Master Mix (MMX).
- E. Přidejte vypočtený objem **RXNMIX** do zkumavky označené MMX.
- F. Přidejte vypočtený objem **BRAF OM** do zkumavky označené MMX.
- G. Přidejte vypočtený objem **MGAC** do zkumavky označené MMX.
- H. Aby došlo k řádnému promíchání, vortexujte 5 sekund.

POZN.: používejte pouze mikrotitrační destičku (AD-destičku) a zalepovací fólii (Roche M/N 05232724001) pro systém cobas® 4800.

- I. Do každé reakční jamky na AD-destičce, která je potřebná pro cyklus, přidejte 25 µl pracovního MMX. Špička pipety se nesmí dotknout destičky mimo danou jamku.

Přidání kontrol a vzorků

- A. Přidejte 25 µl kontroly **BRAF MUT** do jamky **A01** na AD-destičce a pomocí pipetoru dobře smíchejte – odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát.
- B. Pomocí nové pipetovací špičky přidejte 25 µl kontroly **BRAF WT** do jamky **B01** na AD-destičce a pomocí pipetoru dobře smíchejte – odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát.

POZN.: každý cyklus musí obsahovat jako kontrolu BRAF MUT v pozici A01, tak kontrolu BRAF WT v pozici B01. V opačném případě analyzátor cobas z 480 cyklus zneplatní.

POZN.: podle potřeby měňte rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci PCR reakční zkumavky zvnějšku.

- C. Pomocí pipetoru se špičkou bránící vzniku aerosolů přidejte 25 µl zředěné DNA ze vzorku do příslušné jamky obsahující pracovní MMX. Začněte pozicí **C01** na AD-destičce a pokračujte podle vzoru na Obr. 1 níže. Promíchejte obsah jamky pomocí pipetoru – odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát. Ujistěte se, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamky.

POZN.: DNA ze vzorků a kontroly je nutné dát na AD-destičku do jedné hodiny po přípravě pracovního Master Mixu (MMX).

Obr. 1

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

D. Pokračujte, až budou veškeré vzorky přidány na AD-destičku.

E. Zalepte AD-destičku zalepovací fólií (dodanou s destičkami). Pomocí aplikátoru k zalepovací fólii přilepte zalepovací fólii pevně k AD-destičce.

F. Před zahájením amplifikace a detekce se ujistěte, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

POZN.: amplifikace a detekce musí začít do 1 hodiny od okamžiku přidání DNA ze vzorků a kontrol do pracovního MMX.

Zahájení PCR

Podrobné pokyny ke krokům pracovního postupu BRAF naleznete v Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo v Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.

Interpretace výsledků

POZN.: veškerou validaci cyklů a vzorků provádí software cobas® 4800 BRAF AP.

POZN.: platný cyklus může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Jestliže je cyklus platný, lze výsledky vzorků interpretovat dle uvedeného způsobu (viz Tab. 2).

Tab. 2
Interpretace výsledků vzorků

Výsledek testu cobas BRAF	Interpretace
Mutation Detected	Mutace V600 byla detekována v oblasti kodonu 600 genu BRAF v exonu 15
Mutation Not Detected nebo No Mutation Detected*	Mutace V600 nebyla detekována v oblasti kodonu 600 genu BRAF v exonu 15
Invalid	Výsledek je neplatný. Opakujte testování vzorků s neplatnými výsledky podle pokynů v části níže Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky .
Failed	Neúspěšný cyklus způsobený poruchou hardwaru nebo softwaru

* Výsledek „Mutation Not Detected“ (Mutace nedetekována) nebo „No Mutation Detected“ (Nebyla detekována žádná mutace) nevylučuje přítomnost mutace genu BRAF v oblasti kodonu 600, protože výsledky závisí na počtu kopií mutantních sekvencí přítomných ve vzorku a mohou být ovlivněny integritou vzorku, množstvím izolované DNA a přítomností interferujících látek.

Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky

A. Opakujte ředění neplatné zásobní DNA ze vzorku od postupu **Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku** a **Ředění vzorků** v části **AMPLIFIKACE A DETEKCE**.

Pozn.: jestliže není dostatečné množství zásobní DNA ze vzorku pro provedení nového ředění zásobní DNA, vezměte nový 5µm řez tkáně a znovu izolujte DNA pomocí cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) a poté pokračujte krokem B uvedeným níže.

B. Po provedení ředění zásobní DNA na 5 ng/µl podle postupu v části **Ředění vzorků** proveďte další ředění 1:2. Vezměte 20 µl zředěné zásobní DNA a přidejte 20 µl roztoku pro ředění DNA vzorků (**DNA SD**).

C. Pokračujte podle **Příprava pracovního Master Mixu (MMX)** a zbývajících postupů amplifikace a detekce.

Pozn.: pokud je vzorek neplatný po opětovém testování v ředění 1:2, opakujte celý test daného vzorku. Začněte izolací DNA pomocí soupravy cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) a použijte nový 5µm FFPE řez. Pro amplifikaci a detekci použijte standardních 25 µl DNA o koncentraci 5 ng/µl (bez dalšího ředění).

KONTROLA KVALITY

V každém cyklu testu **cobas** BRAF je zahrnuta kontrola mutace (**BRAF MUT**) a kontrola divokého typu (**BRAF WT**). Cyklus je platný, jestliže jamka s kontrolou **BRAF MUT (A01)** i jamka s kontrolou **BRAF WT (B01)** mají platný status kontroly. Pokud je kontrola **BRAF MUT** nebo **BRAF WT** neplatná, cyklus se musí opakovat. Čerstvě si naředte již dříve izolovanou zásobní DNA ze vzorku a připravte si novou AD destičku s kontrolami pro amplifikaci a detekci.

Kontrola mutace BRAF

Výsledek kontroly **BRAF MUT** musí být platný. Pokud jsou výsledky testu kontroly **BRAF MUT** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Kontrola BRAF divokého typu

Výsledek kontroly **BRAF WT** musí být platný. Pokud jsou výsledky testu kontroly **BRAF WT** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti testů na bázi PCR je třeba dbát opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci činidel a amplifikačních směsí.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Testujte pouze indikované typy vzorků. Test **cobas** BRAF byl validován pro použití pouze se vzorky FFPE melanomu a PTC.
2. Test **cobas** BRAF byl validován k použití pouze se soupravou **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190) k extrakci genomické DNA.
3. Detekce mutace závisí na tom, kolik kopií mutační sekvence genu je ve vzorku přítomno, a může ji ovlivňovat integrita vzorku, množství izolované DNA a přítomnost interferujících látek.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy fixace vzorků, transportu, skladování a zpracování vzorků. Postupujte dle kroků uvedených v tomto příbalovém letáku a Návodu k použití systému **cobas®** 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.
5. Přidání enzymu AmpErase k reakční směsi testu **cobas** BRAF umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v této příbalové informaci.
6. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas®** 4800 System.
7. Pouze systém **cobas®** 4800 System byl validován pro použití s tímto produktem. S tímto produktem nebyl validován žádný jiný systém PCR.
8. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli ve své laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi.
9. Vlivy jiných proměnných, jako jsou proměnné fixace vzorku, hodnoceny nebyly.
10. I když vzácně, mutace a varianty v oblastech genu BRAF pokryté primery nebo sondami testu **cobas** BRAF mohou vést k selhání amplifikace alely V600 genu BRAF nebo detekce mutace v kodonu 600.
11. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
12. Melanin je známým inhibitorem PCR reakcí. Souprava pro přípravu vzorků DNA během extrakce odstraní melanin ze vzorku; melanin ve vzorku však může i nadále způsobit neplatné výsledky. Jestliže existuje podezření na inhibici melaninem, doporučuje se zopakovat testování s použitím ředění 1:2, jak je popsáno v části „Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky“.
13. Test mutace V600 genu BRAF na zařízení **cobas** 4800 vykazuje omezenou zkříženou reaktivitu se vzorky s mutacemi jinými než V600E (V600K, V600D a V600E2). Více podrobností viz část „Melanom – Hodnocení neklinických funkčních parametrů“.

14. Vzorky FFPE s degradovanou DNA mohou ovlivnit schopnost testu detekovat mutaci.

15. Test mutace genu BRAF na zařízení **cobas** 4800 je kvalitativní test. Test neslouží pro kvantitativní měření mutace.

I. MELANOM

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

V níže uvedených laboratorních studiích byl obsah nádoru v % stanoven při patologickém zkoumání. Obsah melaninu byl stanoven při patologickém zkoumání a pomocí vlastního testu pracoviště pro stanovení melaninu. Pro výběr vzorků pro testování byla použita obousměrná Sangerova sekvenační metoda. % hladiny mutace bylo stanoveno sekvenováním 454 (kvantitativní hromadně paralelní pyrosekvenační metodou).

Analytická citlivost

Analytická citlivost – limit detekce (LoD)

Minimální množství vstupní DNA, které v 95 % případů dává správné výsledky, bylo stanoveno pomocí dilučních panelů připravených ze tří typů vzorků:

- Směsi vzorků připravených smícháním zásobních DNA získaných z FFPE vzorků s mutací V600E genu BRAF a FFPE vzorků divokého typu genu BRAF pro dosažení specifických hladin mutace.
- Individuální zásobní DNA z FFPE připravené ze tří vzorků FFPE s mutací V600E genu BRAF.
- Směsi buněčné linie připravené smícháním zásobních DNA získaných z buněčné linie s mutací V600E genu BRAF a z buněčné linie divokého typu genu BRAF.

Všechny vzorky použité v této studii byly sekvenovány pomocí sekvenování 454, aby bylo možné stanovit procentuální mutaci každého vzorku.

Analytická citlivost stanovená pomocí směsí vzorků

Zásobní DNA ze vzorku FFPE s mutací V600E genu BRAF byly smíchány se zásobními DNA vzorků FFPE divokého typu genu BRAF, a tak byl získán jeden vzorek s hladinou mutace 10 %, tři vzorky s hladinou mutace 5 % a jeden vzorek s hladinou mutace 3 %. Byl testován rovněž jeden vzorek divokého typu genu BRAF. Po smíchání byly hladiny mutace ověřeny sekvenováním 454. Každá z pěti směsí vzorků s mutací V600E (ale ne se vzorkem divokého typu) byla poté zředěna a byl vytvořen panel uvedený v Tab. 3.

Tab. 3
Příprava dilučního panelu členů ze směsí vzorků

Směs	Průměrné % mutace*	Množství DNA ve členech dilučního panelu (ng/25 µl)**
10% směs	9 % (n = 6)	125; 62,5; 31,3
5% směs 1	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
5% směs 2	5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
5% směs 3	6 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
2,5% směs	3 % (n = 5)	125; 62,5; 31,3
0% (pouze divoký typ)	- - -	125

* Průměrná procentuální mutace směsí testována sekvenováním 454.

** Množství genomické DNA obsažené v každém členu panelu. 25 µl je stejným vstupním objemem pro test.

Pomocí 3 šarží soupravy testu **cobas** BRAF bylo testováno 8 replikátů každého člena panelu (n = 24/člena panelu). V Tab. 4 je uvedena citlivost každé směsi FFPE stanovená nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu V600E BRAF „Mutation Detected“ alespoň 95 % (šedé řádky).

Tab. 4
Citlivost testu cobas BRAF pomocí směsí FFPE

FFPE směs	Procento mutace určené sekvenováním 454	Množství DNA ve členu panelu	Četnost „Mutation Detected“ (n = 24)
10% FFPE směs	9 %	125 ng/25 µl	100 %
		62,5 ng/25 µl	100 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
5% FFPE směs 1	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	75 %
		0,6 ng/25 µl	88 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
5% FFPE směs 2	5 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	92 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	96 %
		0,6 ng/25 µl	58 %
		0,3 ng/25 µl	50 %
5% FFPE směs 3	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	100 %
		0,6 ng/25 µl	96 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
2,5% FFPE směs	3 %	125 ng/25 µl	0 %
		62,5 ng/25 µl	4 %
		31,3 ng/25 µl	4 %
0 % (divoký typ)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Tato studie ukazuje, že test **cobas** BRAF dokáže detekovat mutace V600E genu BRAF v hladinách mutace ≥ 5 % při použití standardní koncentrace 125 ng/25 µl. Schopnost testu detekovat mutace při nižších vstupních hladinách koncentrace DNA ukazuje, že vzorky mohou obsahovat DNA degradovanou fixačním procesem a přesto bude mutace detekována. Všechny výsledky získané ze vzorků divokého typu genu BRAF měly status „Mutation Not Detected“.

Analytická citlivost stanovená pomocí FFPET vzorků

Pro potvrzení detekce 5% mutace ve vzorcích pacientů, 48 jednotlivých 5µm řezů z každého ze 3 FFPET vzorků s mutací V600E genu BRAF obsahující hladiny mutace 6%, 12% a 4% bylo jednotlivě zpracováno pomocí 3 šarží soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a byla izolována DNA. Aby bylo možné stanovit vliv melaninu na test, jeden vzorek (6% mutace) měl vysokou koncentraci melaninu. Sériovým ředěním DNA z každého řezu byl připraven soubor panelů s 6 členy podrobně uvedenými v Tab. 5.

Tab. 5
Příprava dilučního panelu členů z FFPET vzorků

FFPET vzorek	Informace o vzorku		Množství DNA ve členech dilučního panelu (ng/25 µl)
	Průměrná % V600E mutace*	Pigmentace	
Vzorek 1	6 %	Silná pigmentace**	125; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0
Vzorek 2	12 %	NHP***	125; 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5
Vzorek 3	4 %	NHP	125; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0

* Průměrná procentuální mutace vzorku stanovena sekvenováním 454

** Silná pigmentace na základě vizuálního posouzení, koncentrace melaninu = 0,17 µg/25 µl

*** NHP = bez silné pigmentace, založeno na vizuálním vyhodnocení

Pomocí 3 šarží soupravy testu **cobas** BRAF bylo testováno 16 replikátů každého člena panelu (n = 48/člena panelu). Citlivost každého FFPET vzorku byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu V600E BRAF „Mutation Detected“ alespoň 95 % (šedé řádky). Výsledky této studie ukazuje Tab. 6.

Tab. 6
Citlivost testu cobas BRAF pomocí FFPET vzorků

FFPET vzorek	Procento mutace určené sekvenováním 454	Množství DNA ve členu panelu	Četnost „Mutation Detected“ (n = 48)
Vzorek 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 %
Vzorek 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 %
Vzorek 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 %

Tato studie ukázala, že test **cobas** BRAF dokáže detekovat mutace V600E genu BRAF v FFPET vzorcích při hladině mutace ≥ 5 % při použití standardní koncentrace 125 ng/25 µl. Schopnost testu detekovat mutace při nižších vstupních hladinách koncentrace DNA ukazuje, že vzorky mohou obsahovat DNA degradovanou fixačním procesem a přesto bude mutace detekována. Jeden silně pigmentovaný vzorek ve studii neměl vliv na citlivost testu.

Analytická citlivost stanovená pomocí směsi buněčné linie

Zásobní DNA ze dvou buněčných linií melanomu [SK-MEL 28 (mutace V600E genu BRAF) a SK-MEL 2 (divoký typ genu BRAF)] byly smíchány a vznikl vzorek s mutací 5 %, což bylo ověřeno sekvenováním 454. Byly připraveny tři oddělené diluční panely obsahující 125 ng/25 µl až 0 ng/25 µl DNA. Pomocí 3 šarží soupravy testu **cobas** BRAF bylo testováno 20 replikátů každého člena panelu (n = 60/replikátů celkem). Citlivost byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu V600E BRAF „Mutation Detected“ alespoň 95 % (šedý řádek). Výsledky této studie ukazuje Tab. 7.

Tab. 7
Citlivost testu cobas BRAF stanovená pomocí směsi buněčné linie

Směs buněčné linie	Průměrné procento mutace určené sekvenováním 454	Množství DNA ve členu panelu	Četnost „Mutation Detected“ (n = 60)
Směs buněčné linie	5 %	125,0 ng/25 µl	97 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
		15,6 ng/25 µl	95 %
		7,8 ng/25 µl	98 %
		3,9 ng/25 µl	95 %
		2,0 ng/25 µl	82 %
		1,0 ng/25 µl	78 %
		0,5 ng/25 µl	77 %

Test **cobas** BRAF vykázal 95% četnost „Mutation Detected“ při koncentraci 3,9 ng/25 µl, což je ředění 1:32 doporučené vstupní DNA koncentrace 125 ng/25 µl. To znamená, že tento test bude detekovat mutaci V600E genu BRAF, když bude 97 % DNA degradováno kvůli procesu fixace, za předpokladu, že buněčná linie DNA obsahovala 100 % neporušené a amplifikovatelné DNA.

Vstupní rozsah genomu:

Doporučené množství DNA pro test **cobas** BRAF je 125 ng. Chyby ve kvantifikaci DNA a/nebo variacích v množství degradované DNA mohou vést k různým vstupním množstvím genomické DNA. Aby bylo možné vyhodnotit vliv různých množství vstupní genomické DNA, byla z 11 FFPET vzorků melanomu, zvolených na základě stavu mutace a hladiny pigmentace, extrahovaná genomická DNA a sériově naředěná se vstupem reprezentujícím 250 ng, 125 ng, 62,5 ng a 31,3 ng/25 µl. Všechny 4 hladiny DNA byly vyhodnoceny pomocí 2 šarží. Pro všechny hladiny vstupní genomické DNA byly získány očekávané výsledky.

Minimální obsah nádoru

Bylo testováno 33 vzorků mutací V600E genu BRAF, aby byla zjištěna minimální část nádoru nutná pro detekci mutace V600E genu BRAF u vzorků s obsahem nádoru od 5 % do 50 % bez provedení makrodisekce. Pomocí test **cobas** BRAF byl testován 1 řez každého vzorku.

Test **cobas** BRAF správně detekoval všechny vzorky s mutací V600E genu BRAF s minimálním obsahem mutované DNA více než 5 % a minimálním obsahem nádoru alespoň 15 % (Tab. 8). Vzorky s nižším obsahem nádoru než 15 % a méně než 5% hladinou mutace byly označeny jako „Mutation Not Detected“. Další 24 vzorků divokého typu s obsahem nádoru od 5 % do 45 % bylo vyhodnoceno při doporučené vstupní koncentraci DNA 125 ng/25 µl. Všechny vzorky divokého typu byly správně vyhodnoceny. Je nutná makrodisekce vzorků, které obsahují < 50 % oblasti nádorových buněk.

Tab. 8
Výsledky testování 33 vzorků s mutací V600E genu BRAF s různým procentním obsahem nádoru a procentem mutace

Číslo vzorku	Obsah nádoru*	% mutace	Výsledky testu
1	5 % / 5 %	3 %	Mutation Not Detected
2	5 % / 5 %	5 %	Mutation Not Detected
3	5 % / 5 %	1 %	Mutation Not Detected
4	10 % / 10 %	4 %	Mutation Not Detected
5	10 % / 10 %	14 %	Mutation Detected
6	15 % / 10 %	6 %	Mutation Detected
7	15 % / 15 %	23 %	Mutation Detected
8	15 % / 15 %	3 %	Mutation Detected
9	15 % / 15 %	29 %	Mutation Detected
10	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected

Číslo vzorku	Obsah nádoru*	% mutace	Výsledky testu
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

** Obsah nádoru ve vzorku stanovil patolog na základě rozboru prvního a posledního z dvanácti sousedních 5µm řezů každého vzorku. Je uveden obsah nádoru prvního a posledního řezu (např. 95 % / 95 %).*

Zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita testu **cobas** BRAF byla vyhodnocena testováním následujících typů vzorků:

- FFPET vzorky melanomu jiné mutace genu BRAF než V600E s různými hladinami mutace
- Plazmidy jiných mutací genu BRAF než V600E
- Plazmidy homologů genu BRAF
- Kožní mikroorganismy

U zkřížené reaktivity se rovněž vyhodnocovalo, zda přítomnost plazmidů homologů genu BRAF nebo kožních mikroorganismů interferuje s detekcí mutace V600E genu BRAF.

FFPET vzorky melanomu jiné mutace genu BRAF než V600E

Čtrnáct (14) FFPET vzorků melanomu jiné mutace než V600E (V600D, V600E2, V600R nebo V600K) genu BRAF bylo testováno v triplicátu pomocí testu **cobas** BRAF. U osmi vzorků melanomu jiné mutace než V600E genu BRAF všechny tři replikáty vykazaly zkříženou reaktivitu s testem **cobas** BRAF. Těchto osm vzorků bylo: mutace V600D genu BRAF (18% mutace), mutace V600E2 genu BRAF (68% mutace) nebo mutace V600K genu BRAF (vyšší než 30% mutace). U vzorku mutace V600R genu BRAF (23% mutace) nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita, viz Tab. 9.

Tab. 9

Pozorované míry detekce mutace v testu cobas BRAF pro jiné mutace než V600E genu BRAF ve vzorcích FFPET

Číslo vzorku	Stav mutace genu BRAF	Procento mutace	Obsah nádoru*	Stádium nádoru	Četnost „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 %

* Obsah nádoru ve vzorku stanovil patolog na základě rozboru prvního a posledního z dvanácti sousedních 5μm řezů každého vzorku. Je uveden obsah nádoru prvního a posledního řezu (např. 95 % / 95 %).

Byl připraven jedenáctičlenný diluční panel s koncentracemi DNA od 5,0 ng/μl až 0,0049 ng/μl (což odpovídá 125 až 0,1 ng DNA ve vstupním objemu 25 μl pro test). Každý člen panelu byl testován ve třech kopiích, aby mohlo být stanoveno nejnížší množství DNA, které zajistí 100% míru detekce mutace u osmi vzorků, u kterých byla zjištěna zkřížená reaktivita v testu **cobas** BRAF. Bylo zjištěno, že nejnížší množství vstupní DNA předtím, než dojde k vymizení zkřížené reaktivity, je v rozsahu 0,5 ng/25 μl u vzorku s mutací V600K genu BRAF s 69 % mutace a 15,6 ng/25 μl vzorku s mutací V600D genu BRAF s 18 % mutace (Tab. 10).

Tab. 10

Nejnižší množství vstupní DNA, které dokáže detekovat zkříženou reaktivitu na při testu cobas BRAF

Číslo vzorku	Stav mutace genu BRAF	Procento mutace	Nejnižší množství vstupní DNA předtím, než dojde k vymizení zkřížené reaktivity (n = 3)
1	V600D	18 %	15,6 ng/25 μl
2	V600E2	68 %	7,8 ng/25 μl
3	V600K	31 %	3,9 ng/25 μl
4		35 %	3,9 ng/25 μl
5		39 %	3,9 ng/25 μl
6		36 %	2,0 ng/25 μl
7		62 %	3,9 ng/25 μl
8		69 %	0,5 ng/25 μl

Plazmidy jiné mutace genu BRAF než V600E

Pro následujících devět mutací genu BRAF jiných než V600E byly připraveny diluční panely plazmidů s hladinami mutace od 5 % do 75 % na pozadí plazmidu divokého typu: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K a V600R. Tři replikáty každého člena těchto dilučních panelů připravených pro každý plazmid byly testovány pomocí testu **cobas** BRAF. Byla zjištěna zkřížená reaktivita u všech 3 replikátů u plazmidu V600D genu BRAF při $\geq 10\%$ mutaci, plazmidu V600K genu BRAF při $\geq 35\%$ mutaci a plazmidu V600E2 genu BRAF při $\geq 65\%$ mutaci. U zbývajících šesti testovaných mutací genu BRAF nebyla u plazmidů pozorována žádná zkřížená reaktivita.

Plazmidy homologů genu BRAF

Pro tři plazmidy homologů genu BRAF byly připraveny vzorky (pseudogen BRAF, ARAF a RAF1), plazmid s mutací V600E genu BRAF a plazmid divokého typu genu BRAF, jak je uvedeno v Tab. 11. Pomocí testu **cobas** BRAF bylo testováno tři až šest replikátů každého člena panelu.

Tab. 11
Plazmidové vzorky homologů genu BRAF

Panel		Složení podle objemu	
Název	Člen panelu	Složka 1	Složka 2
Pseudogen BRAF	1	95 % pseudogenu BRAF	5 % mutace V600E genu BRAF
	2	100 % pseudogenu BRAF	- - -
ARAF	1	95 % ARAF	5 % mutace V600E genu BRAF
	2	100 % ARAF	- - -
RAF1	1	95 % RAF1	5 % mutace V600E genu BRAF
	2	100 % RAF1	- - -
Kontrola	1	95 % divokého typu genu BRAF	5 % mutace V600E genu BRAF
	2	100 % divokého typu genu BRAF	- - -
	3	95 % elučního pufru pro DNA	5 % mutace V600E genu BRAF

Žádný z těchto tří plazmidů homologů genu BRAF nebyl testem **cobas** BRAF detekován, když byl testován samostatně, což znamená, že plazmidy homologů genu BRAF nevykazují zkříženou reaktivitu s testem.

Plazmid s 5 % mutace V600E genu BRAF za přítomnosti 95 % plazmidů homologů genu BRAF vykázal ve všech případech očekávané výsledky „Mutation Detected“. To znamená, že plazmidy homologů neinterferovaly při detekci mutace V600E genu BRAF.

Kožní mikroorganismy

Zjistilo se, že v testu **cobas** BRAF následující kožní mikroorganismy zkříženě nereagují, když jsou přidány do vzorku FFPET melanomu divokého typu s 1×10^6 CFU během lýzy tkáně:

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

Testované mikroorganismy rovněž neovlivňovaly detekci vzorku FFPET s 8 % mutace V600E genu BRAF, když bylo přidáno 1×10^6 CFU během lýzy tkáně.

Interference

Ukázalo se, že triglyceridy (≤ 74 mM, $2 \times$ CLSI doporučené vysoké koncentrace¹⁷), hemoglobin (≤ 2 mg/ml, $1 \times$ CLSI doporučené vysoké koncentrace¹⁷) a $\leq 95\%$ nekrotická tkáň neinterferovaly s testem **cobas** BRAF, když byla potenciálně interferující látka přidána do lýzy během přípravy vzorku.

Melanin

Vliv vysokých koncentrací endogenního melaninu byl vyhodnocen pomocí vysoce pigmentovaných FFPET vzorků s melanomem. Bylo vybráno celkem 41 unikátních FFPET vzorků s nádorovou tkání s melanomem na základě jejich hladiny pigmentace. 33 bylo vysoce pigmentovaných, 3 byly od afro-američanů a 5 bylo lehce pigmentovaných pro srovnání. U každého vzorku byla extrahována DNA z tkáně a byla stanovena koncentrace melaninu. Byl testován jeden replikát zásobní DNA z každého ze dvou oddílů získaných z každého ze 41 vzorků. Tři vzorky vykázaly neplatné výsledky. Jeden vzorek vykázal výsledek „Mutation Not Detected“, ale tento vzorek byl pod mezí detekce. Tři vzorky s „neplatnými“ výsledky byly použity pro přípravu doporučené koncentrace DNA pro test a dvojnásobného, čtyřnásobného a osminásobného ředění doporučené vstupní koncentrace DNA 125 ng/PCR. Výsledné ředěné vzorky DNA (obsahující celkem 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng nebo 15,6 ng DNA ve 25 µl) byly znovu testovány, aby bylo možné stanovit, zda odpovídající snížení melaninu pomocí ředění umožní získat platné výsledky. Všechny tři vzorky při dvojnásobném ředění vykázaly správné výsledky.

Tab. 12
Shrnutí výsledků testu cobas BRAF s pigmentovanými FFPET vzorky melanomu

ID vzorku	Zředění	Množství melaninu ve vzorku/PCR	Výsledek
1	Žádné (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Dvojnásobné (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Čtyřnásobné (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Osminásobné (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Žádné (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Dvojnásobné (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Čtyřnásobné (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Osminásobné (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Žádné (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Dvojnásobné (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Čtyřnásobné (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Osminásobné (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Výsledky testování 17 vzorků divokého typu ukázaly, že všechny vzorky měly správný výsledek „Mutation Not Detected“ s výjimkou 2 vysoce pigmentovaných vzorků, které vykázaly falešně pozitivní výsledky.

KLINICKÉ VÝSLEDKY

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu **cobas** BRAF byla stanovena pomocí studie na třech externích testovacích pracovištích (2 pracovníci na každém pracovišti), tří šarží činidel a v pěti testovacích dnech nejdoucích po sobě. Použit byl osmičlenný panel vzorků DNA ze FFPET sekci maligního melanomu. Tento panel zahrnoval jak pigmentované, tak nepigmentované vzorky a řadu s různým procentuálním množstvím nádoru a mutantních alel, včetně jednoho vzorku s 5% mezí detekce (LoD). Z 94 cyklů bylo 92 (97,9 %) platných. Z 1442 testovaných vzorků vykázaly 2 vzorky (0,14 %) neplatné výsledky. U všech členů panelu (kromě vzorků LoD) byly správné výsledky u 100 % platných testů, včetně členů panelu s 20% mutací a dvou členů panelu s vysokou pigmentací. U členu panelu LoD byla mutace V600E detekována v 90 % (162/180) vzorků. Žádné vzorky WT (divokého typu) nebyly falešně pozitivní. Můžeme shrnout, že test **cobas** BRAF byl vysoce reprodukovatelný jak u pigmentovaných, tak u nepigmentovaných vzorků, u vzorků s nízkým obsahem nádoru a malým procentem mutantních alel, mezi pracovišti, obsluhami, šaržemi činidel a testovacími dny. Analytická specifita byla 100 %.

Korelace s referenční metodou u klinických vzorků fáze III

Prevalence mutací V600E u klinické zkoušky fáze III byla 46,5 % na základě výsledků testů **cobas** BRAF. To odpovídá prevalenci mutací V600E u pacientů s melanomem, jež se uvádí v literatuře.

Za účelem hodnocení funkční charakteristiky testu **cobas** BRAF ve srovnání s 2× metodou obousměrného Sangerova sekvenování bylo určeno 596 po sobě jdoucích pacientů, kteří se zúčastnili screeningu pro klinické hodnocení vemurafenibu, fáze III, a od kterých byly shromážděny klinické a demografické údaje a údaje získané Sangerovou sekvenační metodou. Z nich bylo 94 nevhodných pacientů kvůli chybějícím kritériím pro zařazení, u 4 pacientů neproběhlo patologické zkoumání a 2 měli neplatné výsledky testu **cobas** BRAF. Ze zbývajících 496 způsobilých pacientů mělo 47 pacientů neplatné výsledky získané Sangerovou sekvenační metodou, takže zbylo 449 vyhodnotitelných pacientů. Primární analýza shody mezi výsledky testu **cobas** BRAF a výsledky testů Sangerovou sekvenační metodou při detekci mutace V600E je uvedena níže v Tab. 13.

Tab. 13
Shrnutí výsledků testu cobas BRAF vs. Sangerova sekvenační metoda

Test cobas BRAF (testovací metoda)	Sangerova sekvenační metoda (referenční metoda)		
	Mutace V600E genu BRAF detekována ^a	Mutace V600E genu BRAF nedetekována ^b	Celkem
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Celkem	222	227	449
Procentní shoda pozitivních (95% CI)	100 % × 216/222 = 97,3 % (94,2 %, 98,8 %)		
Procentní shoda negativních (95% CI)	100 % × 192/227 = 84,6 % (79,3 %, 88,7 %)		
Celková procentní shoda (95% CI)	100 % × 408/449 = 90,9 % (87,8 %, 93,2 %)		

^a Výsledek „Mutation Detected“ označuje přítomnost predominantního typu mutace genu BRAF, V600E (1799 T>A) podle Sangerovy sekvenační metody.

^b Výsledek „Mutation Not Detected“ označuje nepřítomnost predominantního typu mutace genu BRAF, V600E podle Sangerovy sekvenační metody (tj. divoký typ nebo bez mutace, V600D, „V600E2“, V600K, V600R a jiné mutace).

Pozn.: vzorky melanomu s platnými párovými výsledky z obou testů **cobas** BRAF a Sangerovy sekvenační metody.

Pozn.: CI = interval spolehlivosti (skóre).

Všech 41 vzorků, jejichž výsledky testu **cobas** BRAF a Sangerovy sekvenační metody byly neshodné, bylo podrobeno sekvenování 454 (hromadně paralelní pyrosekvenační metodou) jako druhou referenční metodou. Navíc bylo 33 shodných výsledků testu **cobas** BRAF a Sangerovy sekvenační metody testováno sekvenováním 454. Sekundární analýza shody po vyřešení neshodných výsledků je uvedena v Tab. 14.

Ze 6 neshodných výsledků, které měly výsledek „Mutation Not Detected“ u testu **cobas** BRAF a výsledek V600E Sangerovou sekvenační metodou, sekvenování 454 vykazovalo u 5/6 vzorků výsledek „divoký typ“ (jeden vzorek měl neplatný výsledek u sekvenování 454).

Z 8/35 neshodných výsledků, které měly výsledek „Mutation Detected“ u testu **cobas** BRAF a výsledek „divoký typ“ Sangerovou sekvenační metodou, sekvenování 454 detekovalo mutaci V600E u 7/8 vzorků (jeden vzorek měl neplatný výsledek u sekvenování 454).

Z 27/35 neshodných výsledků, které měly výsledek „Mutation Detected“ u testu **cobas** BRAF a výsledek „mutace jiná než V600E“ Sangerovou sekvenační metodou, sekvenování 454 detekovalo mutaci V600K u 24 vzorků, „V600E2“ u jednoho vzorku a V600E u jednoho vzorku. U jednoho vzorku Sangerova sekvenační metoda detekovala mutaci V600D a sekvenování 454 detekovalo divoký typ.

Zkřížená reaktivita testu **cobas** BRAF pro mutaci V600K byla 66 % (25/38).

Shoda se sekvenováním 454 byla 100 % u 33 shodných (test **cobas** BRAF a Sangerova sekvenační metoda) vzorků s mutací V600E a vzorků divokého typu.

Tab. 14

Výsledky testu cobas BRAF vs. Sangerova sekvenační metoda po rozlišení neshodných výsledků sekvenováním 454

Test cobas BRAF (testovací metoda)	Po rozlišení neshodných výsledků sekvenováním 454		
	Mutace V600E genu BRAF detekována	Mutace V600E genu BRAF nedetekována	Celkem
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Celkem	225	224	449
Procentní shoda pozitivních (95% CI)	100 % × 224/225 = 99,6 % (97,5 %, 99,9 %)		
Procentní shoda negativních (95% CI)	100 % × 197/224 = 87,9 % (83,0 %, 91,6 %)		
Celková procentní shoda (95% CI)	100 % × 421/449 = 93,8 % (91,1 %, 95,7 %)		

Distribuce mutací v kodonu 600 genu BRAF

Distribuce mutací v kodonu 600 byla stanovena ve 496 oprávněných případech na základě kombinovaných výsledků Sangerovou sekvenační metodou a sekvenováním 454. Z těchto 496 případů bylo 182 divokého typu a 314 obsahovalo mutaci. Distribuce mutací v kodonu 600 mezi 314 případy pozitivními na mutaci je uvedena v Tab. 15. Mutace V600K byly identifikovány ve 13,4 % všech případů s mutacemi v kodonu 600.

Tab. 15

Distribuce mutací v kodonu 600 genu BRAF u populace pozitivní na mutaci dle stanovení Sangerovou sekvenační metodou a sekvenováním 454

Aminokyselinová sekvence (kodon 600)	Nukleotidová sekvence (1798–1800)	N	% distribuce
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
Celkem mutací v kodonu 600		314	100
Celkem divokého typu v kodonu 600		182	---

Klinická účinnost přípravku ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

Test **cobas** BRAF byl použit jako pomocný test pro výběr pacientů pro léčbu přípravkem ZELBORAF®. Klinická bezpečnost a účinnost přípravku ZELBORAF® byla prokázána ve studii NO25026 (BRIM3), což je mezinárodní, randomizovaná, otevřená, kontrolovaná, multicentrická studie fáze III u dříve neléčených pacientů s neresekovatelným melanomem stádia IIIC nebo IV s mutací V600E genu BRAF k vyhodnocení klinické účinnosti přípravku ZELBORAF® oproti dakarbazinu (standardní léčba). Vzorky FFPET od všech pacientů s melanomem, u nichž bylo zvažováno zařazení k léčbě, byly testovány pomocí testu **cobas** BRAF. Pacienti s výsledkem testu „Mutation Detected“ byli způsobilí k zařazení do klinického hodnocení léku, pokud splnili další kritéria způsobilosti. Pacienti s výsledkem testu „Mutation Not Detected“ nebyli způsobilí k zařazení do tohoto klinického hodnocení. Studie se prováděla přibližně na 104 pracovištích na celém světě (22 center v USA).

Do hodnocení bylo zařazeno 675 pacientů; 337 bylo zařazeno k léčbě vemurafenibem a 338 dakarbazinem. Hlavními cílovými ukazateli účinnosti tohoto klinického hodnocení bylo celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS) vyhodnocené zkoušejícím. Další cílové ukazatele zahrnovaly potvrzenou nejlepší celkovou míru odpovědi vyhodnocenou zkoušejícím.

Vstupní charakteristiky byly vyváženy mezi léčebnými skupinami. Většina pacientů byli muži (56 %) a běloši (99 %), střední věk byl 54 let (24 % bylo ≥ 65 let), všichni pacienti měli stav výkonnosti ECOG 0 nebo 1 a většina pacientů měla metastazující onemocnění (95 %).

Výsledky účinnosti v klinickém hodnocení jsou uvedeny níže v Tab. 16 a na Obr. 2:

Tab. 16

Účinnost přípravku Vemurafenib v léčbě dříve neléčených pacientů s melanomem pozitivním na mutaci BRAFV600E^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dakarbazin (N = 338)	Hodnota p^d
Celkové přežití			
Počet úmrtí	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Poměr rizik (95% CI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Medián přežití (měsíce) (95% CI) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Medián následného sledování (měsíce) (rozmezí)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Poměr rizik přežití bez progrese (95% CI) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Medián PFS (měsíce) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a Dle detekce testem **cobas** BRAF

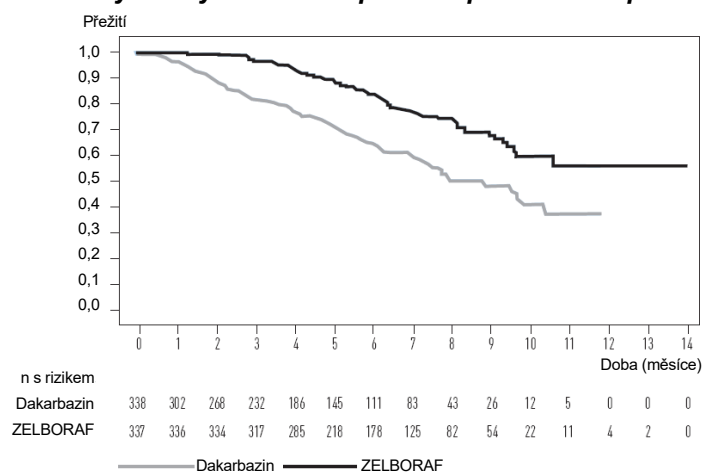
^b Poměr rizik odhadovaný s použitím Coxova modelu; poměr rizik < 1 je ve prospěch vemurafenibu

^c Kaplan-Meierův odhad

^d Nestratifikovaný log-rank test

^e Nedosaženo

Obr. 2
Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití – pacienti bez předchozí léčby



Potvrzená míra celkové odpovědi vyhodnocená zkoušejícím byla 48,4 % (95% CI: 41,6 %, 55,2 %) v rameni s přípravkem ZELBORAF® v porovnání s 5,5 % (95% CI: 2,8 %, 9,3 %) v rameni s dakarbazinem.

Klinická účinnost přípravku COTELLIC® (cobimetinib)^{10, 11}

COTELLIC®, inhibitor MEK, byl testován v klinickém hodnocení (coBRIM) v kombinaci s přípravkem ZELBORAF® v porovnání s přípravkem ZELBORAF® plus placebo. Ke stanovení způsobilosti pro zařazení pacientů do tohoto klinického hodnocení byl použit test **cobas** BRAF. Bezpečnost a účinnost kombinace přípravků COTELLIC® a ZELBORAF® byla stanovena v multicentrickém, randomizovaném (1:1), dvojitém zaslepeném, placebem kontrolovaném klinickém hodnocení prováděném u 495 dříve neléčených pacientů s neresekovatelným či metastazujícím melanomem pozitivním na mutaci V600 genu BRAF. Hlavním cílovým ukazatelem účinnosti bylo přežití bez progresu (PFS) vyhodnocené zkoušejícím dle kritérií RECIST v1.1. Dalšími cílovými ukazateli účinnosti byly potvrzená objektivní míra odpovědi vyhodnocená zkoušejícím (ORR), celkové přežití (OS), PFS na základě vyhodnocení v zaslepeném nezávislém centrálním hodnocení a doba trvání odpovědi (DOR).

Vstupní charakteristiky byly vyváženy mezi léčebnými skupinami. Většina pacientů byli muži (58 %) a běloši (93 %), střední věk byl 55 let, 72 % pacientů mělo stav výkonnosti ECOG 0 a 60 % pacientů mělo stádium onemocnění M1c.

Vzorky FFPET od všech pacientů, u nichž bylo zvažováno zařazení k léčbě, byly testovány pomocí testu **cobas** BRAF. Pacienti s výsledkem „Mutation Detected“ byli způsobilí k zařazení do klinického hodnocení, pokud splnili další kritéria způsobilosti. Pacienti s výsledkem „No Mutation Detected“ nebyli způsobilí k zařazení do klinického hodnocení. U pacientů s mutacemi V600K genu BRAF zahrnutých do klinického hodnocení na základě detekování testem **cobas** BRAF se prokázala bezpečnost a účinnost léčivého přípravku v detekované části populace pacientů s nádory obsahujícími V600K.

Výsledky účinnosti v klinickém hodnocení jsou uvedeny níže v Tab. 17 a na Obr. 3:

Tab. 17
Účinnost přípravku Cobimetinib v porovnání s Vemurafenibem
v léčbě pacientů s melanomem pozitivním na mutaci genu BRAF^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (N = 247)	Placebo + Vemurafenib (N = 248)	Hodnota p
Přežití bez progresce (vyhodnocené zkoušejícím)			
Počet příhod (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progrese	131	169	
Úmrtí	12	11	
Medián PFS (měsíce) (95% CI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Poměr rizik (95% CI) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Celkové přežití			
Počet úmrtí (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Medián přežití (měsíce) (95% CI) ^c	Neodhadnutelné (20,7, neodhadnutelné)	17,0 (15,0, neodhadnutelné)	-
Poměr rizik (95% CI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektivní míra odpovědi			
Objektivní míra odpovědi (95% CI) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Úplná odpověď	16 %	10 %	
Částečná odpověď	54 %	40 %	
Medián doby přežití, měsíce (95% CI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a Dle detekce testem **cobas** BRAF

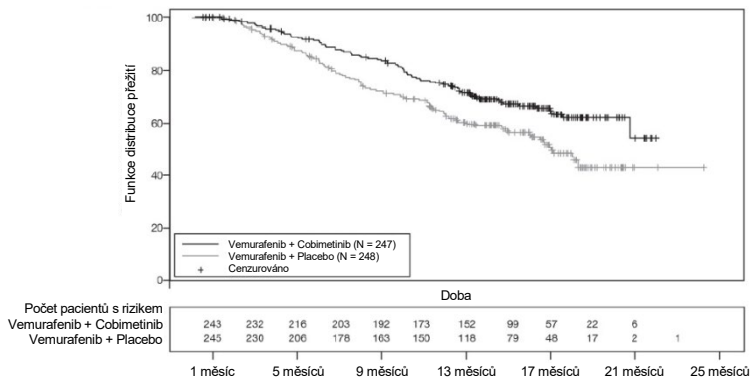
^b Poměr rizik odhadovaný s použitím Coxova modelu; poměr rizik < 1 je ve prospěch kombinace cobimetinib + vemurafenib

^c Kaplan-Meierův odhad

^d Stratifikovaný log-rank test

^e Statistická významnost závisí na porovnání vůči přiřazené hladině alfa 0,019 pro tuto dílčí analýzu

Obr. 3
Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití



Dostupné vzorky nádoru od randomizovaných pacientů byly retrospektivně analyzovány pomocí sekvenování nové generace (NGS) k další klasifikaci mutací V600E nebo V600K genu BRAF; výsledky testu byly získány u 81 % randomizovaných pacientů (400/495). Z pacientů, u jejichž vzorků bylo úspěšně provedeno NGS, mělo 56 ze 400 (14 %) pacientů nádor s mutací V600K genu BRAF a zbývajících pacientů měli nádory s mutací V600E genu BRAF. U 56 nádorů, u nichž byla retrospektivně zjištěna mutace V600K genu BRAF, byla v této analýze četnost mutace 5,1 až 36,6 %. Vývojový trend ve prospěch ramena s kombinací cobimetinib s vemurafenibem byl pozorován u explorační podskupiny při analýzách PFS, OS a ORR u subtypů mutace V600 genu BRAF u 81 % pacientů v tomto klinickém hodnocení, kde byl stanoven typ mutace V600 genu BRAF.

II. PAPILÁRNÍ KARCINOM ŠTÍTNÉ ŽLÁZY (PTC)

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

V níže uvedených laboratorních studiích byly charakteristiky nádoru, jako je obsah nádoru v %, stanoveny při patologickém zkoumání. Pro výběr vzorků pro testování byla použita obousměrná Sangerova sekvenační metoda. % hladiny mutace bylo stanoveno sekvenováním 454 (kvantitativní hromadně paralelní pyrosekvenační metodou).

Analytická citlivost

Analytická citlivost – limit detekce (LoD)

Minimální množství vstupní DNA, které v 95 % případů dává správné výsledky, bylo stanoveno pomocí dilučních panelů připravených ze dvou typů vzorků:

- Směsi vzorků připravených smícháním zásobních DNA získaných z FFPE vzorků s mutací V600E genu BRAF a FFPE vzorků divokého typu genu BRAF pro dosažení specifických hladin mutace.
- Individuální zásobní DNA z FFPE připravené ze dvou vzorků FFPE s mutací V600E genu BRAF.

Všechny vzorky použité v této studii byly sekvenovány pomocí sekvenování 454, aby bylo možné stanovit procentuální mutaci každého vzorku.

Analytická citlivost stanovená pomocí směsí vzorků

Zásobní DNA ze vzorku FFPE s mutací V600E genu BRAF byly smíchány se zásobními DNA vzorků FFPE divokého typu genu BRAF, a tak byl získán jeden vzorek s hladinou mutace 10 %, jeden vzorek s hladinou mutace 5 % a jeden vzorek s hladinou mutace 2 %. Po smíchání byly hladiny mutace ověřeny sekvenováním 454. Každá ze tří směsí vzorků s mutací V600E byla poté rozředěna a byl vytvořen panel členů, jak je uvedeno v Tab. 18.

Tab. 18
Příprava dilučního panelu členů ze směsí vzorků

Směs	Průměrné % mutace*	Množství DNA ve členech dilučního panelu (ng/25 µl)**
10% směs	10 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5% směs	5 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5% směs	2 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0% (pouze divoký typ)	- - -	125

* Průměrná procentuální mutace směsi testována sekvenováním 454.

** Množství genomické DNA obsažené v každém členu panelu. 25 µl je stejným vstupním objemem pro test.

Pomocí 3 šarží soupravy testu **cobas** BRAF bylo testováno 8 replikátů každého člena panelu (n = 24/člena panelu). V Tab. 19 je uvedena citlivost každé směsi FFPET stanovená nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu V600E BRAF „Mutation Detected“ alespoň 95 % (šedé řádky).

Tab. 19
Citlivost testu cobas BRAF pomocí směsí FFPET

FFPET směs	Procento mutace určené sekvenováním 454	Množství DNA ve členu panelu	Četnost „Mutation Detected“ (n = 24)
10% FFPET směs	10 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	100 %
		0,5 ng/25 µl	92 %
		0,2 ng/25 µl	83 %
		0,1 ng/25 µl	29 %
5% FFPET směs	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	83 %
		0,5 ng/25 µl	54 %
		0,2 ng/25 µl	67 %
		0,1 ng/25 µl	25 %
2,5% FFPET směs	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 % (divoký typ)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Tato studie ukazuje, že test **cobas** BRAF dokáže detekovat mutace V600E genu BRAF v hladinách mutace ≥ 5 % při použití standardní koncentrace 125 ng/25 µl. Schopnost testu detekovat mutace při nižších vstupních hladinách koncentrace DNA ukazuje, že vzorky mohou obsahovat DNA degradovanou fixačním procesem a přesto bude mutace detekována. Všechny výsledky získané ze vzorků divokého typu genu BRAF měly status „Mutation Not Detected“.

Analytická citlivost stanovená pomocí FFPET vzorků

Pro potvrzení detekce 5% mutace ve vzorcích pacientů bylo jednotlivě zpracováno 24 jednotlivých 5µm řezů z každého ze dvou FFPET vzorků s mutací V600E genu BRAF obsahující hladiny mutace 6% a 11% pomocí 3 šarží soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a byla izolována DNA. Sériovým ředěním DNA z každého řezu byl připraven soubor panelů s 8 členy podrobně uvedenými v Tab. 20.

Tab. 20
Příprava dilučního panelu členů z FFPET vzorků

	Průměrná % V600E mutace*	Množství DNA ve členech dilučního panelu (ng/25 µl)
Vzorek 1	6 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Vzorek 2	11 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* Průměrná procentuální mutace vzorku stanovena sekvenováním 454

Pomocí 3 šarží soupravy testu **cobas** BRAF bylo testováno 8 replikátů každého člena panelu (n = 24/člena panelu). Citlivost každého FFPE vzorku byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu V600E BRAF „Mutation Detected“ alespoň 95 % (šedé řádky). Výsledky této studie ukazuje Tab. 21.

Tab. 21
Citlivost testu cobas BRAF pomocí FFPE vzorků

FFPE vzorek	Procento mutace určené sekvenováním 454	Množství DNA ve členu panelu	Četnost „Mutation Detected“ (n = 48)
Vzorek 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 %
Vzorek 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 %

Tato studie ukázala, že test **cobas** BRAF dokáže detekovat mutace V600E genu BRAF v FFPE vzorcích při hladině mutace ≥ 5 % při použití standardní koncentrace 125 ng/25 µl. Schopnost testu detekovat mutace při nižších vstupních hladinách koncentrace DNA ukazuje, že vzorky mohou obsahovat DNA degradovanou fixačním procesem a přesto bude mutace detekována.

Opakovatelnost

Pro vyhodnocení opakovatelnosti testu **cobas** BRAF byla provedena studie s použitím dvou šarží činidel, kdy dvě obsluhy během čtyř testovacích dnů testovaly pět FFPE vzorků papilárních karcinomů štítné žlázy. Tyto vzorky FFPE zahrnovaly řadu s různým procentuálním množstvím nádoru (50–70 %) a mutantních alel (16–22 %), včetně dvou vzorků s mutací V600E s 16–18 % mutací ($\sim 3 \times \text{LoD}$). Procentní správnost byla určena pro 100 % testovaných vzorků (80/80). Žádné vzorky WT (divokého typu) nebyly falešně pozitivní. Můžeme shrnout, že test **cobas** BRAF byl vysoce opakovatelný u vzorků s nízkým obsahem nádoru a malým procentem mutantních alel, a to mezi obsluhami, šaržemi činidel a testovacími dny.

Korelace s referenční metodou

Při hodnocení funkční charakteristiky testu **cobas** BRAF ve srovnání s 2× metodou obousměrného Sangerova sekvenování byly u 159 FFPET vzorků PTC získány údaje Sangerovou sekvenační metodou. Primární analýza shody mezi výsledky testu **cobas** BRAF a výsledky testů Sangerovou sekvenační metodou při detekci mutace V600E je uvedena níže v Tab. 22 pro jednu ze dvou testovaných šarží činidel. Druhá šarže vykázala podobné výsledky, kromě jednoho vzorku, u něhož byl výsledek „Mutation Not Detected“. Rozlišení sekvenováním 454 určilo, že daný vzorek obsahoval 1,4 % mutace a byl pod 5% deklarovanou citlivostí testu **cobas** BRAF.

Tab. 22
Shrnutí výsledků testu cobas BRAF vs. Sangerova sekvenační metoda

Test cobas BRAF (testovací metoda)	Sangerova sekvenační metoda (referenční metoda)		
	Mutace V600E genu BRAF detekována ^a	Mutace V600E genu BRAF nedetekována ^b	Celkem
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Celkem	89	70	159
Procentní shoda pozitivních (95% CI)	100 % × 88/89 = 98,9 % (93,9 %, 99,8 %)		
Procentní shoda negativních (95% CI)	100 % × 57/70 = 81,4 % (70,8 %, 88,8 %)		
Celková procentní shoda (95% CI)	100 % × 145/159 = 91,2 % (85,8 %, 94,7 %)		

^a Výsledek „Mutation Detected“ označuje přítomnost predominantního typu mutace genu BRAF, V600E (1799 T>A) podle Sangerovy sekvenační metody.

^b Výsledek „Mutation Not Detected“ označuje nepřítomnost predominantního typu mutace genu BRAF, V600E podle Sangerovy sekvenační metody (tj. divoký typ nebo bez mutace a jiné mutace).

Pozn.: CI = interval spolehlivosti (skóre).

Všechny vzorky, jejichž výsledky testu **cobas** BRAF a Sangerovy sekvenační metody byly neshodné, byly podrobeny sekvenování 454 (hromadně paralelní pyrosekvenační metodou) jako druhou referenční metodou. Sekundární analýza shody po vyřešení neshodných výsledků je uvedena v Tab. 23.

Jeden neshodný vzorek měl výsledek „Mutation Not Detected“ dle testu **cobas** BRAF a dle Sangerovy sekvenační metody výsledek V600E. Dle sekvenování 454 byl výsledek divokého typu shodný s testem **cobas** BRAF.

U dvanácti ze třinácti neshodných vzorků, u nichž test **cobas** BRAF detekoval mutaci a Sangerova sekvenační metoda určila divoký typ, sekvenování 454 určilo mutaci V600E (četnost alely 1,2–19 %), stejně jako test **cobas** BRAF.

U zbývajících neshodného vzorku, u něhož test **cobas** BRAF detekoval mutaci V600E, Sangerova sekvenační metoda určila divoký typ a sekvenování 454 určilo rovněž divoký typ. Následné další sekvenování 454 potvrdilo nízkoprocentní mutaci V600E.

Tab. 23

Výsledky testu cobas BRAF vs. Sangerova sekvenační metoda po rozlišení neshodných výsledků sekvenováním 454

Test cobas BRAF (testovací metoda)	Sangerova sekvenační metoda po rozlišení neshodných výsledků sekvenováním 454		
	Mutace V600E genu BRAF detekována	Mutace V600E genu BRAF nedetekována	Celkem
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Celkem	101	58	159
Procentní shoda pozitivních (95% CI)	100 % × 101/101 = 100,0 % (96,3 %, 100,0 %)		
Procentní shoda negativních (95% CI)	100 % × 57/58 = 98,3 % (90,9 %, 99,7 %)		
Celková procentní shoda (95% CI)	100 % × 158/159 = 99,4 % (96,5 %, 99,9 %)		

SEZNAM ZNAČEK VÝSLEDKŮ

Značky výsledků lze najít na záložce „Results“. Kód značky ukazuje příčinu značky; kódy uvádí následující Tab. 24. Tab. 25 uvádí všechny značky interpretace výsledků, které jsou relevantní pro uživatele.

Tab. 24
Příčina značky

Kód značky začíná písmenem	Příčina značky	Příklad
M*	Mnohočetné či jiné důvody	M6
R	Interpretace výsledků	R200
Z*	Analyzátor	Z1

* Viz Návod k použití systému **cobas**® 4800 nebo Asistent uživatele systému **cobas**® 4800.

Tab. 25
Seznam značek interpretace výsledků

Kód značky	Závažnost	Popis	Doporučený úkon
R200	Chyba	Kontrola mutace je neplatná.	Cyklus opakujte. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že: 1. Pozorovaná hodnota ohybu u kontroly mutace byla pod stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš nízký). K tomu může docházet při kontaminaci DNA nebo při chybě algoritmu kvůli atypickému vzorci fluorescence. 2. Pozorovaná hodnota ohybu u kontroly mutace byla nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš vysoký). Možné příčiny: 1) nesprávná příprava pracovního Master Mixu; 2) chyba pipetování při přidávání pracovního Master Mixu do jamky mikrotitrační destičky; nebo 3) chyba pipetování při přidávání kontroly mutace do jamky mikrotitrační destičky.
R201	Chyba	Kontrola divokého typu neplatná.	Cyklus opakujte. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že: 1. Pozorovaná hodnota ohybu u kontroly divokého typu byla pod stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš nízký). K tomu může docházet při kontaminaci DNA nebo při chybě algoritmu kvůli atypickému vzorci fluorescence. 2. Pozorovaná hodnota ohybu u kontroly divokého typu byla nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš vysoký). Možné příčiny: 1) nesprávná příprava pracovního Master Mixu; 2) chyba pipetování při přidávání pracovního Master Mixu do jamky mikrotitrační destičky; nebo 3) chyba pipetování při přidávání kontroly divokého typu do jamky mikrotitrační destičky.
R202	Chyba	Ct mutace není detekována.	Opakujte vzorek. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že u vzorku nebyla pozorována hodnota ohybu mutace. To může znamenat nepřítomnost mutace ve vzorku nebo to může znamenat jednu nebo více ze skutečností níže: 1. malé procento mutantních sekvencí, které je pod mezí detekce testu; 2. špatná kvalita genomické DNA ze vzorku; 3. nevhodné zpracování vzorku; 4. přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku; 5. výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých primery a/nebo mutantní sondou; 6. chyba při pipetování vzorku nebo možnost, že DNA vzorků nebyla přidána do reakční jamky.

Kód značky	Závažnost	Popis	Doporučený úkon
R203	Chyba	Ct divokého typu nebyla detekována.	Opakujte vzorek. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že u vzorku nebyla pozorována hodnota ohybu divokého typu. Nepřítomnost hodnoty ohybu divokého typu může znamenat jednu nebo více ze skutečností níže: 1. špatná kvalita genomické DNA ze vzorku; 2. nevhodné zpracování vzorku; 3. přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku; 4. výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých primery a/nebo sondou pro gen divokého typu; 5. možnost, že DNA vzorků nebyla přidána do jedné či více jamek.
R204	Chyba	Ct mutace je mimo rozmezí testu.	Opakujte vzorek. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že: 1. Pozorovaná hodnota ohybu u mutantního vzorku byla pod stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš nízký). K tomu může dojít, když je směs PCR přeplněna koncentrovanou genomickou DNA nebo při chybě algoritmu kvůli atypickému vzorci fluorescence. 2. Pozorovaná hodnota ohybu u mutantního vzorku byla nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš vysoký). To může znamenat jednu nebo více ze skutečností níže: • malé procento mutantních sekvencí, které je pod mezí detekce testu; • chyba pipetování při přidávání DNA vzorku do reakční jamky; • špatná kvalita genomické DNA ze vzorku; • nevhodné zpracování vzorku; • přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku; • výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých primery a/nebo mutantní sondou.
R205	Chyba	Ct divokého typu je mimo rozmezí testu.	Opakujte vzorek. Přečtěte si příbalový leták k danému testu. Tento kód značky ukazuje, že: 1. Pozorovaná hodnota ohybu u vzorku divokého typu byla pod stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš nízký). K tomu může dojít, když je směs PCR přeplněna koncentrovanou genomickou DNA nebo při chybě algoritmu kvůli atypickému vzorci fluorescence. 2. Pozorovaná hodnota ohybu u vzorku divokého typu byla nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš vysoký). To může znamenat jednu nebo více ze skutečností níže: • chyba pipetování při přidávání DNA vzorku do reakční jamky; • špatná kvalita genomické DNA ze vzorku; • nevhodné zpracování vzorku; • přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku; • výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých primery a/nebo sondou pro gen divokého typu.

LITERATURA

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

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Aktualizovány části ÚČEL POUŽITÍ a SOUHRN A VÝKLAD TESTU. Přidány části Klinická účinnost přípravku ZELBORAF® (vemurafenib) a Klinická účinnost přípravku COTELLIC® (cobimetinib). Přidána informace o stabilitě preparátu na sklíčku v části ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ. Přidáno prohlášení o melaninu v části PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ. Přidány obecné jazykové aktualizace k vysvětlení a harmonizaci s návodem k použití pro test mutace V600 genu BRAF US-IVD na zařízení cobas® 4800. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.
11/2019	„FFPET“ opraveno na „FFPET“ a opraven font symbolu „větší nebo rovno“ na s. 24 pro správné zobrazení v PDF. Aktualizovaná stránka s harmonizovanými symboly. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Odstraněny následující informace o soupravě pro přípravu vzorků DNA: • Seznam činidel a informace o složení • Související procedurální kroky a poznámky Přidán odkaz na návod k použití soupravy cobas® DNA Sample Preparation Kit na začátek a do části Procedurální omezení. Aktualizované provozní příručky „Příručka obsluhy pro systém cobas® 4800 nebo Asistent uživatele systému cobas® 4800“. Opravy překlepů a aktualizace pro dosažení ucelenosti a standardního znění v celém textu a shody s návodem k použití v USA. Přidány značky výsledků. Aktualizovaný odkaz na International Air Transport Association. Byl aktualizován oddíl se symboly, obchodními značkami a patenty a adresy distributorů. Přidáno prohlášení o tom, že bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.

Vyrobeno ve Spojených státech



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

Obchodní značky a patenty

COBAS, COBAS Z a AMPERASE jsou obchodní známky společnosti Roche.

Všechny ostatní názvy výrobků a ochranné známky jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

Technika prevence přenosu v enzymu AmpErase je kryta patentem USA č. 7,687,247, který je vlastnictvím společnosti Life Technologies, a je licencována společností Roche Molecular Systems, Inc.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-12



V označování diagnostických produktů společnosti Roche PCR se používají následující symboly.



Pomocný software



Číslo šarže



Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství



Biologická rizika



Datový list s čárovými kódy



Katalogové číslo



Čtěte návod k použití



Pouze pro vyhodnocení účinnosti IVD



Obsah vystačí pro <n> testů



Dolní mez přiřazeného rozmezí



Obsah soupravy



Výrobce



Distribuce



Uchovávejte v temnu



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



Omezení teploty



Definiční soubor testu



Datum expirace



Horní mez přiřazeného rozmezí

Rx Only

Pouze pro USA: Podle federálního zákona smí být tento přístroj prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.



Globální číslo obchodní položky



Datum výroby



Značka shody CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro značku shody CE pro diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*.

Technická podpora pro zákazníky v USA 1-800-526-1247