

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



DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO.

cobas <sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit	DNA SP	24 Tests	P/N: 05985536190
cobas <sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test	BRAF	24 Tests	P/N: 05985595190

**INDICATION :** l'achat de ce produit autorise l'acheteur à l'utiliser à des fins d'amplification et de détection des séquences d'acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR - polymerase chain reaction) et des processus associés pour des diagnostics in vitro humains. Aucun brevet général ou autre licence de tout type autre que ce droit spécifique d'utilisation par l'achat n'est ainsi octroyé.

## USAGE PRÉVU

Le test de mutation cobas<sup>®</sup> BRAF V600 est un instrument diagnostique in vitro destiné à la détection qualitative de la mutation BRAF V600E dans l'ADN provenant de tissu mélanomateux humain fixé à la formaline et enrobé de paraffine. Le test de mutation cobas<sup>®</sup> BRAF V600 est un test de PCR en temps réel à utiliser avec le système cobas<sup>®</sup> 4800 et qui sert à identifier les patients atteints de mélanome dont les tumeurs sont porteuses de la mutation V600E sur le proto-oncogène BRAF.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Des mutations activatrices du proto-oncogène BRAF se produisent dans de nombreux cancers humains, notamment le mélanome malin, le cancer colorectal, le cancer des ovaires et le cancer de la thyroïde<sup>1,2</sup>. Des mutations du BRAF ont été identifiées dans 40 à 60 % des mélanomes malins<sup>3</sup>. Les mutations du BRAF sont également courantes dans le naevus bénin, laissant supposer qu'elles constituent un événement très précoce<sup>4</sup>. La découverte de telles mutations somatiques du gène BRAF dans le mélanome et d'autres tumeurs humaines a participé à l'élucidation du rôle central de la kinase BRAF dans les voies de signalisation contrôlant la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires. Dans les cellules normales, le BRAF fait partie de la voie de signalisation hautement régulée médiant les effets des récepteurs des facteurs de croissance (tels que l'EGFR), par l'intermédiaire des protéines RAS, RAF, MEK et ERF. Les mutations oncogènes dans le BRAF entraînent une augmentation de la fonction kinase, rendant ainsi la voie RAF-MEK-ERK constitutivement active en l'absence de facteurs de croissance typiques.

La majorité des mutations BRAF dans le mélanome et d'autres tumeurs humaines se produit dans le codon 600<sup>5</sup>. Un certain nombre de mutations de dinucléotides affectant le codon 600 (V600K, V600R et V600D) ont également été observées, moins couramment, principalement dans le mélanome et rarement dans d'autres tumeurs, comme le cancer colorectal.

Le test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 est un dosage par PCR en temps réel conçu pour détecter la présence de la mutation V600E (T1799A).

## PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 se base sur deux grands procédés : (1) préparation manuelle des échantillons pour obtenir de l'ADN génomique à partir de tissu FFPE (fixés à la formaline, enrobés de paraffine); (2) amplification par PCR de l'ADN cible à l'aide d'une paire d'amorces complémentaires et de deux sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores différents. Une sonde est conçue afin de détecter la séquence BRAF V600 de type sauvage et l'autre est conçue afin de détecter la séquence de mutation V600E. Deux témoins externes de cycle d'analyse sont fournis et l'allèle de type sauvage sert de témoin interne complet du processus.

### Préparation des échantillons

Les échantillons de tissu FFPE sont traités et l'ADN génomique est isolé à l'aide de la trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas<sup>®</sup>, une préparation manuelle standard reposant sur la liaison de l'acide nucléique à des fibres de verre. Une coupe déparaffinée de 5 µm de tissu FFPE est lysée par incubation à température élevée à l'aide d'un tampon de liaison/lyse chaotrope et protéatique qui libère les acides nucléiques et protège l'ADN génomique libéré contre des DNases. Ensuite, on ajoute de l'isopropanol au mélange de lyse, qui est centrifugé dans une colonne contenant un filtre en fibres de verre. Au cours de la centrifugation, l'ADN génomique se lie à la surface du filtre en fibres de verre. Les substances non liées, comme les sels, les protéines et autres impuretés cellulaires, sont retirées par centrifugation. Les acides nucléiques absorbés sont lavés puis élués dans une solution aqueuse. La quantité d'ADN génomique est déterminée par spectrophotomètre et ajustée à une concentration fixe devant être ajoutée au mélange d'amplification/détection. L'ADN cible est ensuite amplifié et détecté sur l'analyseur cobas z 480 à l'aide des réactifs d'amplification et de détection fournis dans la trousse de test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600.

## Amplification PCR et détection

### Sélection des cibles

Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 utilise des amorces qui définissent une séquence de 116 paires de bases de la région du génome humain contenant le site de l'exon 15 BRAF V600E. Le gène BRAF complet n'est pas amplifié. Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 est conçu pour détecter le changement de nucléotide 1799 T>A dans le gène BRAF qui entraîne une substitution valine à acide glutamique au codon 600 (V600E). Les sondes TaqMan marquées par fluorophore, spécifiques aux cibles BRAF de type sauvage et V600E se lient aux séquences sauvages et V600E respectivement. La séquence sauvage et la séquence V600E sont détectées par des canaux optiques dédiés à chaque séquence.

### Amplification des cibles

L'ADN polymérase *Thermus species* Z05 est utilisé pour l'amplification de la cible. Le mélange réactionnel de PCR est d'abord chauffé afin de dénaturer l'ADN génomique et d'exposer les séquences cibles aux amorces. À mesure que le mélange refroidit, les amorces en amont et en aval s'hybrident avec les séquences d'ADN cible. L'ADN polymérase Z05, en présence d'ion métallique divalent et de dNTP en excès, allonge chaque amorce hybridée, synthétisant ainsi un deuxième brin d'ADN. Le premier cycle de PCR est alors achevé, produisant une copie d'ADN bicaténaire de la région cible de 116 paires de bases du gène BRAF. Ce processus est répété pendant un certain nombre de cycles, chaque cycle doublant effectivement la quantité d'ADN d'amplicon. L'amplification se produit uniquement dans la région du gène BRAF entre la paire d'amorces appropriée. Le gène complet n'est pas amplifié.


### Détection automatisée en temps réel




Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 utilise la technologie d'amplification par PCR en temps réel. Dans la réaction, chaque sonde oligonucléotidique spécifique à la cible est marquée par un fluorophore servant de rapporteur et par une molécule quencher qui absorbe les émissions fluorescentes du fluorophore rapporteur quand la sonde est intacte. Au cours de chaque cycle d'amplification, une sonde complémentaire de la séquence d'ADN monocaténaire dans l'amplicon se lie et est ensuite clivée par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase Z05. Une fois que le fluorophore rapporteur est séparé du quencher par cette activité nucléase, une fluorescence d'une longueur d'onde caractéristique peut être mesurée lorsque le fluorophore rapporteur est excité par un spectre de lumière approprié. Deux fluorophores rapporteurs sont utilisés pour marquer la sonde spécifique aux cibles BRAF de type sauvage (WT, V600) et la sonde de mutation BRAF V600E. L'amplification des deux séquences BRAF peut être détectée de façon indépendante dans un seul puits réactionnel en mesurant la fluorescence à deux longueurs d'onde caractéristiques.

### Amplification sélective

L'amplification sélective des acides nucléiques cibles à partir des échantillons est réalisée avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 par l'utilisation de l'enzyme AmpErase (uracil-N-glycosylase) et du désoxyuridine triphosphate (dUTP)<sup>6</sup>. L'enzyme AmpErase reconnaît les brins d'ADN contenant de la désoxyuridine et catalyse leur destruction, mais pas celle de l'ADN contenant de la thymidine. L'ADN naturel ne contient pas de désoxyuridine, alors que l'amplicon en contient toujours en raison de l'utilisation de dUTP comme un des nucléotides triphosphates du mélange réactionnel. Ainsi, seuls l'amplicon contient de la désoxyuridine. La désoxyuridine rend les amplicons contaminants susceptibles d'être détruits par l'enzyme AmpErase avant l'amplification de l'ADN cible. L'enzyme AmpErase, contenue dans le mélange réactionnel, catalyse le clivage de l'ADN contenant de la désoxyuridine au niveau des résidus de désoxyuridine, en ouvrant la chaîne de désoxyribose en position C1. Lorsqu'elle est chauffée au cours de la première étape du thermocyclage, à un pH alcalin, la chaîne d'ADN de l'amplicon se scinde à la position de la désoxyuridine, rendant ainsi l'ADN non amplifiable. L'enzyme AmpErase est inactive à une température supérieure à 55 °C (c'est-à-dire pendant toutes les étapes du cycle thermique) et ne détruit donc pas l'amplicon cible.

### RÉACTIFS

cobas® DNA Sample Preparation Kit Trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas® (P/N : 05985536190)	DNA SP	24 tests
DNA TLB (Tampon de lyse de tissu d'ADN) Tampon Tris-HCl Chlorure de potassium 0,04 % d'EDTA 0,1 % de triton X-100 0,09 % d'azoture de sodium		1 x 10 mL
PK (Protéinase K) Protéinase K (lyophilisée) Xn Protéinase K		1 x 100 mg
 Nocif		

DNA PBB (Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine)		1 x 10 mL
Tampon Tris-HCl		
49,6 % de chlorhydrate de guanidine		
0,05 % d'urée		
17,3 % de triton X-100		
Xn  49,6 % (p/p) de chlorhydrate de guanidine		
Nocif		
WB I (Tampon de lavage I de l'ADN)		1 x 25 mL
Tampon Tris-HCl		
64 % de chlorhydrate de guanidine		
Xn  64 % (p/p) de chlorhydrate de guanidine		
Nocif		
WB II (Tampon de lavage II de l'ADN)		1 x 12,5 mL
Tampon Tris-HCl		
Chlorure de sodium		
DNA EB (Tampon d'élution de l'ADN)		1 x 6 mL
Tampon Tris-HCl		
0,09 % d'azoture de sodium		
FT (Tubes de filtration avec bouchons)		1 x 25 unités
CT (Tubes de prélèvement)		3 x 25 unités
cobas <sup>®</sup> 4800 BRAF V600 Mutation Test (P/N : 05985595190)		24 tests
RXNMIX (mélange réactionnel)		3 x 0,16 mL
Tampon tricine		
Acétate de potassium		
Hydroxyde de potassium		
Glycérol		
Tween 20		
EDTA		
5 % de diméthylsulfoxyde		
< 0,09 % de dNTP		
< 0,10 % d'ADN polymérase Z05 (d'origine microbienne)		
< 0,10 % d'enzyme AmpErase (uracile-N-glycosylase) (d'origine microbienne)		
< 0,003 % d'aptamère oligonucléotidique		
0,08 % d'azoture de sodium		
MGAC (Acétate de magnésium)		3 x 0,15 mL
Acétate de magnésium		
0,09 % d'azoture de sodium		
BRAF OM (Mélange oligo BRAF)		3 x 0,13 mL
Tampon Tris-HCl		
EDTA		
0,09 % d'azoture de sodium		
ARN poly rA (synthétique)		
< 0,01 % d'amorces BRAF en amont et en aval		
< 0,01 % de sondes BRAF marquées par fluorescence		

BRAF MUT (Témoin mutant BRAF) Tampon Tris-HCl EDTA ARN poly rA (synthétique) 0,05 % d'azoture de sodium < 0,001 % d'ADN plasmidique (d'origine microbienne) contenant une séquence mutante de BRAF < 0,001 % d'ADN plasmidique (d'origine microbienne) contenant une séquence de type sauvage de BRAF	2 x 0,13 mL
BRAF WT (Témoin BRAF de type sauvage) Tampon Tris-HCl EDTA ARN poly rA (synthétique) 0,05 % d'azoture de sodium < 0,001 % d'ADN plasmidique (d'origine microbienne) contenant une séquence de type sauvage de BRAF	2 x 0,13 mL
DNA SD (Diluant d'échantillon d'ADN) Tampon Tris-HCl 0,09 % d'azoture de sodium	2 x 1 mL

#### MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- A. DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO.
  - B. Ce test est prévu pour une utilisation avec des échantillons de tissu fixés à la formaline et enrobés de paraffine.
  - C. Ne pas pipeter à la bouche.
  - D. Ne pas manger, boire ni fumer dans les zones de travail de laboratoire.
  - E. Éviter la contamination des réactifs par des microbes et par l'ADN.
  - F. Éliminer les réactifs non utilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, fédérale, provinciale et locale.
  - G. Ne pas utiliser les trousse après leur date de péremption.
  - H. Ne pas mélanger de réactifs provenant de trousse ou de lots différents.
  - I. Porter des gants et en changer entre la manipulation des échantillons et celle des réactifs cobas<sup>®</sup> 4800 pour éviter toute contamination.
  - J. Pour éviter toute contamination du mélange réactionnel actif avec les échantillons d'ADN, l'amplification et la détection doivent être effectuées dans une zone séparée de celle de l'isolation de l'ADN. La zone de travail d'amplification et de détection doit être soigneusement nettoyée avant d'effectuer la préparation du mélange réactionnel. Pour un nettoyage adéquat, toutes les surfaces, y compris les portoirs et les pipetteurs, doivent être essuyées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %\*, suivi d'un essuyage avec une solution d'éthanol à 70 %.
  - K. Les solutions DNA PBB et WB I contiennent du chlorhydrate de guanidine. Si du liquide contenant ce tampon est renversé, nettoyer avec un détergent de laboratoire adéquat et de l'eau. En cas de déversement de liquide contenant des agents potentiellement infectieux, nettoyer la zone affectée d'abord avec du détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 0,5 %\*. En cas de déversement de liquide sur l'analyseur cobas z 480, suivre les instructions du manuel d'utilisation du système cobas<sup>®</sup> 4800.
- \*REMARQUE : l'eau de Javel liquide vendue dans le commerce contient de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 5,25 %. Une dilution de l'eau de Javel selon un rapport de 1:10 donnera une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %.
- L. Les échantillons doivent être manipulés comme s'il s'agissait d'agents infectieux, en appliquant les procédures de laboratoire décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>7</sup> et dans le document du CLSI M29-A3<sup>8</sup>.
  - M. DNA TLB et DNA PBB contiennent du Triton X-100, irritant pour les membranes muqueuses. Éviter tout contact avec les yeux, la peau et les membranes muqueuses.
  - N. DNA TLB, DNA EB, RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT et DNA SD contiennent de l'azoture de sodium. L'azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre et former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination des solutions contenant de l'azoture de sodium dans les lavabos de laboratoire, rincer les drains à grande eau froide pour éviter l'accumulation d'azotures.
  - O. Le xylène est un produit chimique dangereux et doit être utilisé dans une hotte chimique. Mettre au rebut avec les déchets chimiques conformément aux réglementations fédérale, provinciale, territoriale et locale.
  - P. Porter des lunettes de protection, une blouse de laboratoire et des gants jetables lors de la manipulation de tout réactif. Éviter le contact de ces matériaux avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement à grande eau. Des brûlures peuvent apparaître en l'absence de traitement. En cas de déversement, diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
  - Q. Tous les articles jetables sont à usage unique. Ne pas les réutiliser.
  - R. Ne pas utiliser les articles jetables au-delà de leur date de péremption.

- S. Ne pas utiliser de solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) pour nettoyer l'analyseur cobas z 480. Nettoyer l'analyseur cobas z 480 en suivant les procédures détaillées dans le manuel d'utilisation du système cobas® 4800.
- T. Pour plus d'information sur les mises en garde, précautions et procédures visant à réduire le risque de contamination pour l'analyseur cobas z 480, consulter le manuel d'utilisation du système cobas® 4800.
- U. Il est conseillé d'utiliser des pipettes stériles jetables et des embouts de pipette exempts de DNase.

#### CONSERVATION ET MANIPULATION

- A. Ne pas congeler les réactifs.
- B. Conserver DNA TLB, DNA PBB, WB I, WB II, DNA EB, FT et CT à une température comprise entre 15 et 30 °C. Après ouverture du flacon, ces réactifs restent stables pendant 8 utilisations, jusqu'à 90 jours ou jusqu'à la date de péremption, selon la première éventualité.
- C. Conserver PK entre 15 et 30 °C. Après ajout d'eau stérile sans nucléase à PK, conserver la solution PK reconstituée non utilisée par aliquotes de 450 µL à -20 °C. Une fois reconstituée, la solution PK doit être utilisée dans les 90 jours ou avant la date d'expiration, selon la première éventualité.
- D. Après l'ajout d'éthanol absolu, conserver WB I et WB II à une température comprise entre 15 et 30 °C. Ces solutions actives restent stables pendant 8 utilisations, jusqu'à 90 jours ou jusqu'à la date de péremption, selon la première éventualité.
- E. Conserver RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT et DNA SD à une température comprise entre 2 et 8 °C. Après ouverture du flacon, ces réactifs restent stables pendant 4 utilisations, jusqu'à 60 jours ou jusqu'à la date de péremption, selon la première éventualité.
- F. BRAF OM et le mélange réactionnel actif (préparé en ajoutant BRAF OM et MGAC à RXNMIX) doivent être protégés d'une exposition prolongée à la lumière.
- G. Le mélange réactionnel actif (préparé par l'ajout de BRAF OM et MGAC à RXNMIX) doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière. Les échantillons et témoins préparés doivent être ajoutés dans l'heure qui suit la préparation du mélange réactionnel actif.
- H. Les échantillons traités sont stables jusqu'à 24 heures à une température comprise entre 20 et 30 °C, jusqu'à 14 jours entre 2 et 8 °C ou jusqu'à 60 jours congelés à -20 °C. Les échantillons traités (ADN extrait) sont stables après avoir subi 4 cycles de congélation-décongélation. L'ADN extrait doit être amplifié au cours des périodes recommandées de conservation ou avant la date de péremption indiquée sur la trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas® pour extraire l'ADN, selon la première éventualité.
- I. L'amplification doit être démarrée au maximum 1 heure après l'ajout des échantillons et des témoins traités au mélange réactionnel actif (préparé par l'ajout de BRAF OM et de MGAC à RXNMIX).

#### MATÉRIEL FOURNI

- A. cobas® DNA Sample Preparation Kit  
Trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas®  
(P/N : 05985536190)

DNA SP
--------

24 tests

DNA TLB

(Tampon de lyse de tissu d'ADN)

PK

(Protéinase K)

DNA PBB

(Tampon de liaison à la paraffine de l'ADN)

WB I

(Tampon de lavage I de l'ADN)

WB II

(Tampon de lavage II de l'ADN)

DNA EB

(Tampon d'éluion de l'ADN)

FT

(Tubes de filtration avec bouchons)

CT

(Tubes de prélèvement)

RXNMIX

(Mélange réactionnel) (bouchon avec bouton de couleur blanc cassé)

MGAC

(Acétate de magnésium) (bouchon avec bouton jaune)

BRAF OM

(Mélange oligo BRAF) (bouchon noir avec bouton blanc)

BRAF MUT

(Témoin mutant BRAF) (bouchon avec bouton rouge)

BRAF WT

(Témoin BRAF de type sauvage) (bouchon avec bouton bleu)

DNA SD

(Diluant échantillon d'ADN) (bouchon avec bouton violet)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Xylène (Sigma, n° de réf. 247642 ou Fisher Scientific, n° de réf. X5-4)
- Éthanol absolu (Sigma, n° de réf. E7023 ou Fisher Scientific, n° de réf. BP2818-500)
- Isopropanol (Sigma, n° de réf. 190764 ou Fisher Scientific, n° de réf. A451-1)
- Eau stérile (eau de qualité PCR Applied Biosystems, n° de réf. AM9937 ou eau de qualité biologique moléculaire Thermo Scientific, n° de réf. SH-3053801)
- Pipettes sérologiques jetables et stériles : 5 et 25 mL
- Plaque à micropuits (plaque AD) et film scelleur (Roche P/N 05232724001) du système cobas® 4800
- Pipetteurs multi-canaux\* (capacité 10 µL, 20 µL, 200 µL et 1000 µL) avec embouts de protection contre les aérosols ou à déplacement positif, exempts de DNase
- Dispositif d'aide au pipetage (Drummond, P/N : 4-000-100 ou équivalent)
- Microcentrifugeuse de table standard avec capacité de 20 000 x g (Eppendorf 5417C ou équivalent)\*\*
- Deux (2) blocs à chaleur sèche avec capacité de chauffage de tubes de microcentrifugeuse à 56 °C et 90 °C\*\*
- Tubes de microcentrifugeuse Safe-Lock de 1,5 mL, stériles, sans RNase/DNase, de qualité PCR (Eppendorf, n° de réf. 022363212)
- Spectrophotomètre UV-Vis Nanodrop (Thermo Scientific ND-1000 ou ND-2000)\*\*
- Mélangeur vortex\*\*
- Portoirs pour tubes de microcentrifugeuse
- Gants jetables, non poudrés
- Thermomètre étalonné pour bloc à chaleur sèche\*\*
- Bain-marie\*\* pouvant maintenir une température de 37 °C
- Lame à tranchant unique ou similaire

\* Les pipettes doivent être entretenues conformément aux instructions du fabricant et leur précision ne doit pas différer de plus de 3 % du volume déclaré. Utiliser des embouts à filtre (protection contre les aérosols) ou à déplacement positif et exempts de DNase chaque fois que cela est spécifié afin d'éviter toute dégradation de l'échantillon et toute contamination croisée.

\*\* Tout le matériel doit être entretenu correctement, conformément aux instructions du fabricant.

Instruments et logiciel

- Analyseur cobas z 480
- Unité de contrôle du système cobas® 4800 SR2 avec image Windows XP
- Logiciel du système cobas® 4800 SR2, version 2.0 ou supérieure
- Logiciel d'analyse BRAF, version 1.0 ou supérieure
- Lecteur de codes-barres ext. USB (Roche P/N 05339910001)
- Imprimante HP P2055d (Roche P/N 05704375001)

## PRÉLÈVEMENT, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

REMARQUE : manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux.

### A. Prélèvement des échantillons

Les échantillons de tissu FFPE ont été validés pour une utilisation avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

### B. Transport des échantillons

Les échantillons de tissu FFPE peuvent être transportés à une température comprise entre 15 et 30 °C. Le transport des échantillons de tissu FFPE doit satisfaire aux normes fédérales, provinciales, territoriales et locale pour le transport d'agents étiologiques<sup>9</sup>.

### C. Conservation des échantillons

Les échantillons de tissu FFPE peuvent être conservés à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 12 mois après la date de prélèvement.

Les sections de 5 µm montées sur lames peuvent être conservées à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 60 jours.

## MODE D'EMPLOI

REMARQUE : tous les réactifs, à l'exception de RXNMIX, MGAC et BRAF OM doivent être à température ambiante avant utilisation. RXN MIX, MGAC et BRAF OM peuvent être pris directement de l'emplacement de conservation entre 2 et 8 °C pour préparer le mélange réactionnel actif.

REMARQUE : seules des sections de tissu FFPE de 5 µm d'épaisseur contenant au moins 50 % de cellules tumorales peuvent être utilisées dans le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. Tout échantillon contenant moins de 50 % de cellules tumorales devra subir une macro-dissection avant le déparaffinage.

REMARQUE : se référer au manuel d'utilisation du système cobas® 4800 pour des instructions d'utilisation détaillées concernant l'analyseur cobas z 480.

REMARQUE : les blocs à chaleur sèche permettant de chauffer les tubes de centrifugeuse doivent être allumés et réglés à 56 °C et 90 °C.

### Taille de la série

La trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 est conçue pour l'analyse d'un minimum de 3 échantillons plus témoins et d'un maximum de 24 échantillons plus témoins. Il est possible d'analyser moins de 3 échantillons plus témoins, mais cela risque d'entraîner un volume de réactifs insuffisant pour analyser un total de 24 échantillons plus témoins avec la trousse. Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 contient des réactifs en quantité suffisante pour 8 cycles d'analyse de 3 échantillons plus témoins. Un témoin mutant du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 [BRAf MUT] et un témoin de type sauvage du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 [BRAf WT] sont nécessaires pour chaque cycle d'analyse (voir la section « Contrôle de qualité »).

### Procédure de travail

REMARQUE : le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 peut être utilisé pour 24 échantillons en un cycle d'analyse. Pour maximiser l'utilisation des réactifs, un cycle d'analyse doit inclure au minimum trois (3) échantillons de patients plus les témoins.

Le processus de test avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 consiste en une préparation manuelle des échantillons à l'aide de la trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas® DNA suivie par l'amplification/la détection sur l'analyseur cobas z 480 à l'aide de la trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. La taille des cycles d'analyse peut varier d'un échantillon plus témoins à 24 échantillons plus témoins.

### Préparation des réactifs

1. Reconstituer la Protéinase K (PK) en ajoutant 4,5 mL d'eau stérile (de qualité PCR) au flacon à l'aide d'une pipette sérologique jetable et stérile de 5 mL. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Aliqueter 450 µL de PK reconstituée dans des tubes Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL et conserver à -20 °C. Si la Protéinase K a déjà été reconstituée et congelée, décongeler un nombre suffisant d'aliquotes pour traiter le nombre d'échantillons à analyser avant le déparaffinage (il faut 70 µL de PK reconstituée pour chaque échantillon).
2. Toutes les solutions conservées entre 15 et 30 °C doivent être claires. En présence d'un précipité dans l'un des réactifs, chauffer la solution dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution du précipité. Ne pas utiliser tant que tous les précipités ne sont pas dissous.
3. Préparer le Tampon de lavage I de l'ADN (WB I) actif en ajoutant 15 mL d'éthanol absolu au flacon de WB I. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon WB I actif à une température comprise entre 15 et 30 °C.
4. Préparer le Tampon de lavage II de l'ADN (WB II) actif en ajoutant 50 mL d'éthanol absolu au flacon de WB II. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon WB II actif à une température comprise entre 15 et 30 °C.

### Déparaffinage des sections de tissu FFPE montées sur lames

Remarque : le xylène est un produit chimique dangereux. Toutes les étapes du déparaffinage doivent être effectuées sous une hotte chimique. Voir « Mises en garde et précautions ».

- A. Ajouter une lame sur laquelle est montée une section de tissu FFPE de 5 µm dans un récipient contenant une quantité suffisante de xylène pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.

- B. Transférer la lame vers le récipient avec une quantité d'éthanol absolu suffisante pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.
- C. Retirer la lame et laisser la section sécher complètement à l'air (5 à 10 minutes).
- D. Effectuer une macro-dissection si l'échantillon contient moins de 25 % de cellules tumorales.
- E. Étiqueter un tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL pour chaque échantillon, avec l'information d'identification de l'échantillon.
- F. Ajouter 180 µL de DNA TLB dans le tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL étiqueté.
- G. Ajouter 70 µL de PK reconstituée au tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL contenant du DNA TLB.
- H. Racler le tissu pour le retirer de la lame et immerger dans le mélange DNA TLB et PK.
- I. Continuer à l'étape A de la procédure Isolation de l'ADN.

#### Déparaffinage des sections de tissu FFPE non montées sur lames

Remarque : le xylène est un produit chimique dangereux. Toutes les étapes du déparaffinage doivent être effectuées sous une hotte chimique. Voir « Mises en garde et précautions ».

- A. Placer une section de tissu FFPE de 5 µm dans un tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL étiqueté avec l'information d'identification d'échantillon pour chaque échantillon.
- B. Ajouter 500 µL de xylène à un tube Safe-Lock de microcentrifugeuse contenant la section de tissu FFPE.
- C. Bien mélanger au vortex pendant 10 secondes.
- D. Laisser le tube reposer pendant 5 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C.
- E. Ajouter 500 µL d'éthanol absolu et mélanger au vortex pendant 10 secondes.
- F. Laisser le tube reposer pendant 5 minutes à une température comprise entre 15 et 30 °C.
- G. Centrifuger entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 2 minutes et retirer le surnageant sans disperser le culot. Mettre le surnageant au rebut avec les déchets chimiques.
- H. Ajouter 1 mL d'éthanol absolu et passer au vortex pendant 10 secondes.
- I. Centrifuger entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 2 minutes et retirer le surnageant sans disperser le culot. Mettre le surnageant au rebut avec les déchets chimiques.

REMARQUE : si le culot flotte dans le surnageant restant, centrifuger à nouveau pendant 1 minute entre 16 000 x g et 20 000 x g. Retirer tout surnageant restant.

- J. Sécher le culot tissulaire pendant 10 minutes à 56 °C dans un bloc chauffant, les tubes étant ouverts.

REMARQUE : s'assurer que l'éthanol s'est complètement évaporé et que le culot est sec avant de passer à l'étape suivante.

REMARQUE : si nécessaire, les culots séchés peuvent être conservés 24 heures à une température comprise entre 2 et 8 °C.

- K. Remettre le culot tissulaire en suspension dans 180 µL de Tampon de lyse de tissu d'ADN (DNA TLB).
- L. Ajouter 70 µL de PK reconstituée.
- M. Continuer à l'étape A de la procédure Isolation de l'ADN.

#### Isolation de l'ADN

- A. Passer au vortex le tube contenant le mélange échantillon/DNA TLB/PK pendant 30 secondes.

REMARQUE : le tissu doit être totalement immergé dans le mélange DNA TLB/PK.

- B. Placer le tube dans le bloc chauffant à sec à 56 °C et incubé pendant 60 minutes.
- C. Passer le tube au vortex pendant 10 secondes.

REMARQUE : le tissu doit être totalement immergé dans le mélange DNA TLB/PK.

- D. Placer le tube dans le bloc chauffant à sec à 90 °C et incubé pendant 60 minutes.

REMARQUE : pendant l'incubation, préparer le nombre nécessaire de tubes de filtration (FT) avec bouchon à charnière en les plaçant sur les tubes de prélèvement (CT) et étiqueter chaque unité FT/CT avec l'identification correcte sur le bouchon de chaque FT.

REMARQUE : chaque échantillon nécessite 1 FT, 3 CT et un tube d'éluion (tube de microcentrifugeuse d'1,5 mL).

REMARQUE : pendant l'incubation, étiqueter le nombre nécessaire de tubes d'éluion (tubes de centrifugeuse de 1,5 mL) avec l'identification d'échantillon correcte.

- E. Laisser le tube refroidir à une température comprise entre 15 et 30 °C. Après refroidissement, centrifuger par à-coups pour recueillir tout éventuel liquide en excès provenant du bouchon.
- F. Ajouter 200 µL de DNA PBB et mélanger en pipettant et en rejetant 3 fois.
- G. Incuber le tube à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 10 minutes.
- H. Ajouter 100 µL d'isopropanol à chaque tube et mélanger le lysat en pipettant et en rejetant 3 fois.
- I. Transférer tout le lysat dans l'unité FT/CT correctement étiquetée.



- J. Centrifuger les unités FT/CT à 8000 x g pendant 1 minute.
- K. Placer chaque FT sur un nouveau CT. Jeter la fraction contenue dans l'ancien CT avec les déchets chimiques et mettre au rebut l'ancien CT de façon appropriée.
- L. Ajouter 500 µL de WB I actif au FT.
- REMARQUE : la préparation du WB I actif est décrite à la section « Préparation des réactifs ».
- M. Centrifuger les unités FT/CT à 8000 x g pendant 1 minute.
- N. Jeter la fraction contenue dans chaque CT avec les déchets chimiques. Replacer le FT sur le même CT.
- O. Ajouter 500 µL de WB II actif au FT.
- REMARQUE : la préparation du WB II actif est décrite à la section « Préparation des réactifs ».
- P. Centrifuger les unités FT/CT à 8000 x g pendant 1 minute.
- Q. Placer un FT sur un nouveau CT. Jeter la fraction contenue dans l'ancien CT avec les déchets chimiques et mettre au rebut le CT utilisé de façon appropriée.
- R. Centrifuger les unités FT/CT entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 1 minute afin de sécher la membrane du filtre.
- S. Placer le tube FT dans un tube d'éluion (tube de centrifugeuse d'1,5 mL) pré-étiqueté avec l'identification de l'échantillon. Jeter la fraction contenue dans l'ancien CT avec les déchets chimiques et mettre au rebut le CT utilisé de façon appropriée.
- T. Ajouter 100 µL de DNA EB au centre de la membrane du FT sans toucher la membrane du FT.
- U. Incuber le FT avec le tube d'éluion à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 5 minutes.
- V. Centrifuger le FT avec le tube d'éluion à 8000 x g pendant 1 minute pour recueillir l'éluat dans le tube d'éluion (tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL pré-étiqueté). Mettre au rebut le FT utilisé de façon appropriée. L'éluat est constitué du stock d'ADN.
- W. Fermer les bouchons des tubes d'éluion. Passer à l'étape A de la section « Quantification de l'ADN ».
- REMARQUE : la mesure de la concentration de l'ADN doit être effectuée immédiatement après la procédure d'isolation de l'ADN, avant conservation.

#### Quantification de l'ADN :

- A. Mélanger chaque stock d'ADN en le passant au vortex pendant 5 secondes avant la quantification.
- B. Quantifier l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Nanodrop (ND-1000 ou ND-2000) conformément au protocole indiqué par le fabricant. Utiliser DNA EB comme blanc pour l'instrument. Il est en moyenne nécessaire d'effectuer 2 lectures. Les deux mesures ne doivent pas différer de plus de  $\pm 10\%$  l'une par rapport à l'autre lorsque les lectures de concentration d'ADN sont  $\geq 20,0$  ng/µL. Pour des lectures de concentration d'ADN  $< 20,0$  ng/µL, les deux mesures ne doivent pas différer de plus de  $\pm 2,0$  ng/µL.
- C. La concentration du stock d'ADN doit être  $\geq 5$  ng/µL pour effectuer le test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600. Une seule amplification/détection est effectuée par échantillon, en utilisant 25 µL d'une dilution à 5 ng/µL du stock d'ADN (au total 125 ng).
- REMARQUE : chaque stock d'ADN doit avoir une concentration minimale de 5 ng/µL pour effectuer le test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600. Si la concentration du stock d'ADN est  $< 5$  ng/µL, la procédure d'isolation de l'ADN devra être répétée pour cet échantillon à l'aide de deux sections de tissu FFPE de 5 µm. Après le déparaffinage, passer à l'étape D du « Déparaffinage des sections de tissu FFPE montées sur lames » ou à l'étape K du « Déparaffinage des sections de tissu FFPE non montées sur lames » en combinant les tissus des deux sections dans un même tube. Continuer la procédure d'isolation de l'ADN. Si la concentration du stock d'ADN est  $< 5$  ng/µL, il peut être nécessaire de demander un autre échantillon de tissu FFPE au site clinique de référence.
- REMARQUE : conserver le stock d'ADN (échantillon traité) à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 2 semaines ou à -20 °C pendant 60 jours. L'ADN doit être amplifié au cours des périodes recommandées de conservation ou avant la date de péremption indiquée sur la trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas<sup>®</sup> pour extraire l'ADN, selon la première éventualité.

#### AMPLIFICATION ET DÉTECTION

- REMARQUE : pour éviter toute contamination du mélange réactionnel actif avec les échantillons d'ADN, l'amplification et la détection doivent être effectuées dans une zone séparée de celle de l'isolation de l'ADN. La zone de travail d'amplification et de détection doit être soigneusement nettoyée avant d'effectuer la préparation du mélange réactionnel. Pour un nettoyage adéquat, toutes les surfaces, y compris les portoirs et les pipetteurs, doivent être essuyées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %, suivi d'un essuyage avec une solution d'éthanol à 70 %. L'eau de Javel liquide vendue dans le commerce contient de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 5,25 %. Une dilution de l'eau de Javel selon un rapport de 1:10 donnera une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %.

#### Préparation de l'instrument :

- Se référer au manuel d'utilisation de l'instrument cobas<sup>®</sup> 4800 pour un mode d'emploi détaillé concernant la configuration pour un nouveau cycle d'analyse.

Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon :

Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon à des concentrations comprises entre 5 ng/μL et 35 ng/μL

REMARQUE : les stocks d'ADN des échantillons doivent être dilués immédiatement avant l'amplification et la détection.

REMARQUE : une seule amplification/détection est effectuée par échantillon, en utilisant 25 μL d'une dilution à 5 ng/μL du stock d'ADN (au total 125 ng).

A. Pour chaque échantillon, déterminer la quantité de stock d'ADN nécessaire à l'aide de la formule suivante :

Volume de stock d'ADN nécessaire =  $(35 \mu\text{L} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) / \text{concentration du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}$

B. Pour chaque échantillon, déterminer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD) nécessaire à l'aide de la formule suivante :

Volume de DNA SD nécessaire en μL =  $(35 \mu\text{L} - \text{Volume de stock d'ADN nécessaire en } \mu\text{L})$

Exemple :

Concentration du stock d'ADN = 21 ng/μL

A. Volume de stock d'ADN nécessaire =  $(35 \mu\text{L} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) / 21 \text{ ng}/\mu\text{L} = 8,3 \mu\text{L}$

B. Volume de DNA SD nécessaire en μL =  $(35 \mu\text{L} - 8,3 \mu\text{L}) = 26,7 \mu\text{L}$

Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon à des concentrations > 35 ng/μL

REMARQUE : les stocks d'ADN des échantillons doivent être dilués immédiatement avant l'amplification et la détection.

REMARQUE : une seule amplification/détection est effectuée par échantillon, en utilisant 25 μL d'une dilution à 5 ng/μL du stock d'ADN (au total 125 ng).

A. Si la concentration du stock d'ADN est > 35 ng/μL, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD) nécessaire pour préparer au moins 35 μL de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μL de stock d'ADN.

Vol. de DNA SD nécessaire en μL =  $((5 \mu\text{L de stock d'ADN} \times \text{conc. du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}) / (5 \text{ ng}/\mu\text{L})) - 5 \mu\text{L}$

B. Utiliser le volume calculé de DNA SD pour diluer 5 μL de stock d'ADN.

Exemple :

Concentration du stock d'ADN = 42 ng/μL

A. Vol. de DNA SD nécessaire en μL =  $((5 \mu\text{L} \times 42 \text{ ng}/\mu\text{L}) / (5 \text{ ng}/\mu\text{L})) - 5 \mu\text{L} = 37 \mu\text{L}$

B. Utiliser le volume calculé de DNA SD pour diluer 5 μL de stock d'ADN.

Dilution de l'échantillon

A. Préparer le nombre approprié de tubes Safe-Lock de microcentrifugation de 1,5 mL pour les dilutions des stocks d'ADN en les étiquetant avec l'identification d'échantillon appropriée dans la zone d'ajout des échantillons.

B. À l'aide d'un pipetteur doté d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols, pipeter le volume calculé de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD) dans chaque tube d'échantillon étiqueté.

C. Passer au vortex chaque échantillon de stock d'ADN pendant 10 secondes.

D. À l'aide d'un pipetteur doté d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols, pipeter délicatement le volume calculé de chaque stock d'ADN d'échantillon dans le tube étiqueté de façon appropriée contenant le DNA SD. Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque échantillon.

E. Fermer et mélanger chaque stock d'ADN d'échantillon en le passant au vortex pendant 10 secondes.

F. Changer de gants.

Préparation du mélange réactionnel (MMX) actif

REMARQUE : le mélange Oligo BRAF et le MMX actif sont sensibles à la lumière. Tout mélange ouvert de BRAF OM et de MMX actif doit être protégé d'une exposition prolongée à la lumière.

- A. Calculer le volume de RXNMIX nécessaire à l'aide de la formule suivante :  
 Volume de RXNMIX nécessaire = (nombre d'échantillons + 2 témoins + 1) x 10 µL
- B. Calculer le volume de BRAF OM nécessaire à l'aide de la formule suivante :  
 Volume de BRAF OM nécessaire = (nombre d'échantillons + 2 témoins + 1) x 8 µL
- C. Calculer le volume de MGAC nécessaire à l'aide de la formule suivante :  
 Volume de MGAC nécessaire = (nombre d'échantillons + 2 témoins + 1) x 7 µL

Le tableau 1 peut être utilisé pour déterminer le volume de chaque réactif nécessaire pour la préparation du MMX actif en fonction du nombre d'échantillons inclus dans le cycle d'analyse.

Tableau 1

<b>Volumes de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif</b>											
<b>Nombre d'échantillons*</b>											
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>RXN MIX</b>	<b>10 µL</b>	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
<b>BRAF OM</b>	<b>8 µL</b>	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
<b>MGAC</b>	<b>7 µL</b>	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
<b>Volume total (µL)</b>		<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>175</b>	<b>200</b>	<b>225</b>	<b>250</b>	<b>275</b>	<b>300</b>	<b>325</b>

\* Nombre d'échantillons + 2 témoins + 1

- D. Retirer le nombre approprié de flacons de RXNMIX, BRAF OM et MGAC de l'emplacement de conservation à une température comprise entre 2 et 8 °C. Passer chaque réactif au vortex pendant 5 secondes afin de recueillir le liquide au fond du tube avant utilisation. Étiqueter un tube de microcentrifugation stérile pour le mélange réactionnel actif (MMX).
- E. Ajouter le volume calculé de RXNMIX au tube MMX étiqueté.
- F. Ajouter le volume calculé de BRAF OM au tube MMX étiqueté.
- G. Ajouter le volume calculé de MGAC au tube MMX étiqueté.
- H. Passer le tube au vortex pendant 5 secondes afin d'assurer un mélange adéquat.

REMARQUE : les échantillons et les témoins doivent être ajoutés à la plaque à micropuits dans un délai de 1 heure après la préparation du mélange réactionnel (MMX) actif.

REMARQUE : utiliser uniquement les plaques à micropuits (plaque AD) et le film scelleur (Roche P/N 05232724001) du système cobas® 4800.

- I. Ajouter avec précaution 25 µL de MMX actif à chaque puits réactionnel de la plaque à micropuits (plaque AD) nécessaire pour le cycle d'analyse. Ne pas toucher la plaque à l'extérieur du puits avec l'embout de la pipette.

Ajout des témoins et des échantillons :

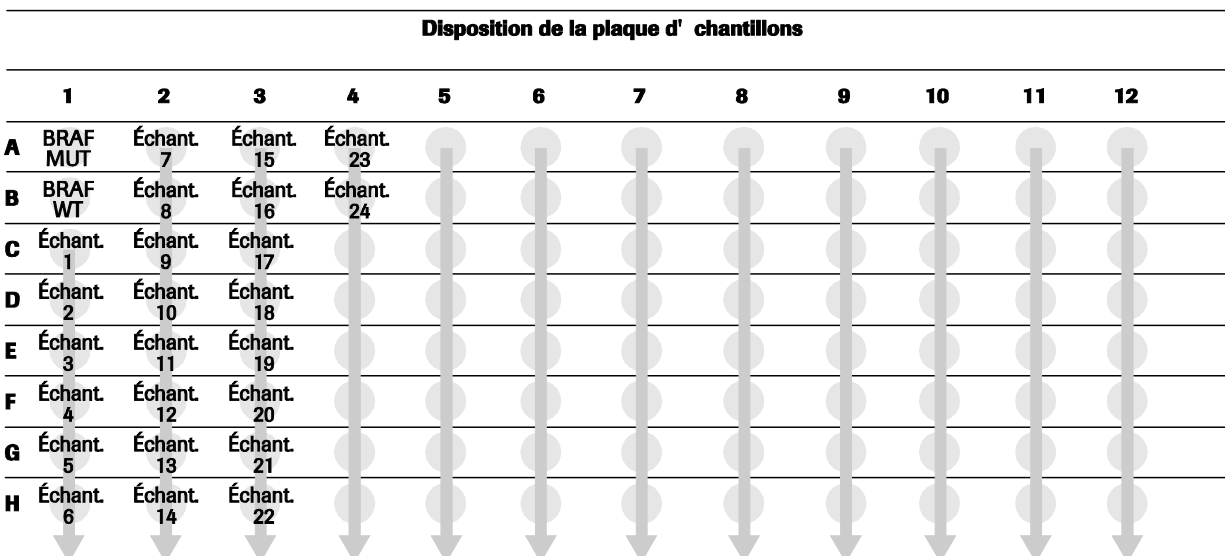
- A. Ajouter 25 µL de témoin BRAF MUT au puits A01 de la plaque à micropuits (plaque AD) et bien mélanger à l'aide du pipetteur en aspirant puis en distribuant le liquide dans le puits au moins deux fois.
- B. En utilisant un embout de pipette neuf, ajouter 25 µL de témoin BRAF WT au puits B01 de la plaque à micropuits (plaque AD) et bien mélanger à l'aide du pipetteur en aspirant puis en distribuant le liquide dans le puits au moins deux fois.

REMARQUE : chaque cycle d'analyse doit contenir un témoin BRAF MUT en position A01 et un témoin BRAF WT en position B01. Dans le cas contraire, le cycle d'analyse serait invalidé par l'analyseur cobas z 480.

REMARQUE : changer de gants selon les besoins afin d'éviter toute contamination entre les échantillons ainsi qu'une contamination via la face externe des tubes de réaction de PCR.

- C. À l'aide d'un pipetteur doté d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols, ajouter 25 µL d'ADN d'échantillon dilué au puits approprié contenant le MMX actif, en commençant par la position C01 de la plaque à micropuits (plaque AD), en suivant le modèle de la figure 1 ci-dessous. Mélanger le contenu du puits en utilisant le pipetteur pour aspirer et distribuer le liquide dans le puits au moins deux fois. S'assurer que tout le liquide est au fond du puits.

Figure 1



- D. Continuer jusqu'à ce que tous les échantillons du test aient été ajoutés à la plaque à micropuits (plaque AD).
- E. Couvrir la plaque à micropuits (plaque AD) à l'aide du film scelleur (fourni avec les plaques). Utiliser l'applicateur de film scelleur afin de s'assurer que le film scelleur adhère bien à la plaque à micropuits (plaque AD).
- F. Vérifier que tout le liquide est dans le fond de chaque puits avant de démarrer l'amplification et la détection.
- REMARQUE : l'amplification et la détection doivent être démarrées dans un délai de 1 heure après l'ajout de l'ADN des échantillons au MMX actif.

#### Démarrage de la PCR

Se reporter au manuel d'utilisation du test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600 pour obtenir les instructions détaillées des étapes de la procédure de travail BRAF.

#### INTERPRETATION DES RESULTATS

REMARQUE : l'ensemble des validations de cycle d'analyse et d'échantillon est effectué par le logiciel cobas<sup>®</sup> 4800.

REMARQUE : un cycle d'analyse valide peut comporter des résultats d'échantillon valides et invalides.

Si le cycle est valide, interpréter les résultats des échantillons comme le montre le tableau 2 :

Tableau 2  
Interprétation des résultats du test de mutation cobas<sup>®</sup> 4800 BRAF V600

Résultats du test de mutation cobas <sup>®</sup> 4800 BRAF V600	Interprétation
Mutation Detected	Mutation détectée dans le site du codon 600 BRAF de l'exon 15
Mutation Not Detected ou No Mutation Detected*	Mutation non détectée dans le site du codon 600 BRAF de l'exon 15
Invalid	Le résultat est invalide. Répéter l'analyse des échantillons présentant des résultats invalides en suivant les instructions mentionnées à la section Réanalyse des échantillons présentant des résultats invalides ci-dessous.
Failed	Échec du cycle d'analyse en raison d'un problème matériel ou logiciel (Contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.)

\* Un résultat « Mutation Not Detected » ou « No Mutation Detected » n'exclut pas la présence d'une mutation dans le site du codon 600 du BRAF, car les résultats dépendent du pourcentage de séquences mutantes, de l'intégrité des échantillons, de l'absence d'inhibiteurs et d'une quantité suffisante d'ADN détectée.

## Réanalyse des échantillons présentant des résultats invalides

- A. Répéter la dilution du stock d'ADN de l'échantillon invalide en démarrant à partir des procédures Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon et Dilution de l'échantillon de la section AMPLIFICATION ET DÉTECTION.
- B. Après avoir effectué la dilution du stock d'ADN à 5 ng/μL décrite à la section Dilution de l'échantillon, effectuer une dilution supplémentaire au 1:2 en prenant 20 μL de stock d'ADN dilué et en ajoutant 20 μL de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD).
- C. Continuer en effectuant la procédure Préparation du mélange réactionnel (MMX) actif et en effectuant le reste de la procédure d'amplification et de détection.

Remarque : si l'échantillon est toujours invalide après réanalyse à une dilution au 1:2, répéter la totalité de la procédure de test pour cet échantillon, en commençant par le déparaffinage et l'isolation de l'ADN sur une nouvelle section de tissu FFPE de 5 μm. La concentration standard d'ADN de 25 μL à 5 ng/μL (sans autre dilution) doit être utilisée pour l'amplification et la détection.

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un jeu de témoin mutant du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (BRAF MUT) et un jeu de témoin de type sauvage (BRAF WT) sont inclus dans chaque cycle d'analyse. Un cycle d'analyse est valide si l'état de contrôle des deux puits des témoins BRAF MUT (A01) et BRAF WT (B01) est valide. Si l'un des témoins BRAF MUT ou BRAF WT est invalide, le cycle d'analyse doit être répété. Préparer une nouvelle dilution du stock d'ADN d'échantillon précédemment isolé afin de réaliser une nouvelle plaque à micropuits (plaque AD) avec les témoins adéquats pour effectuer une procédure d'amplification et de détection.

### Témoin mutant BRAF

Le résultat du témoin BRAF MUT doit être « Valid ». Si le témoin BRAF MUT produit régulièrement des résultats invalides, contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.

### Témoin BRAF de type sauvage

Le résultat du témoin BRAF WT doit être « Valid ». Si le témoin BRAF WT produit régulièrement des résultats invalides, contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.

## PRÉCAUTIONS RELATIVES À LA PROCÉDURE

Comme pour toute procédure de test, une bonne technique de laboratoire est essentielle pour une bonne performance de ce dosage. En raison de la sensibilité analytique élevée de ce test, il convient de porter une attention toute particulière pour éviter la contamination des réactifs et des mélanges d'amplification.

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Ne tester que les types d'échantillon indiqués. Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 n'a été validé que pour une utilisation sur des échantillons de tissu FFPE de mélanome.
2. Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 n'a été validé que pour une utilisation avec la trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas® (Roche P/N : 05985536190) pour l'extraction de l'ADN génomique.
3. La détection d'une mutation dépend du nombre de copies du gène mutant présentes dans l'échantillon et peut être affectée par l'intégrité de l'échantillon, la quantité d'ADN isolé, ainsi que par la présence de substances interférentes.
4. Pour que les résultats obtenus soient fiables, il faut que les échantillons aient été fixés, transportés, conservés et traités de façon appropriée. Suivre les procédures indiquées dans la présente notice et dans le manuel d'utilisation du système cobas® 4800.
5. L'ajout de l'enzyme AmpErase dans le mélange réactionnel du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 permet l'amplification sélective de l'ADN cible; toutefois, de bonnes pratiques de laboratoire et le respect strict des procédures décrites dans la présente notice sont nécessaires pour éviter la contamination des réactifs.
6. L'utilisation de ce produit doit être limitée au personnel ayant reçu une formation sur les techniques de PCR et l'utilisation du système cobas® 4800.
7. Seul l'analyseur cobas z 480 a été validé pour une utilisation avec ce produit. Aucun autre système de PCR ne peut être utilisé avec ce produit.
8. Étant donné les différences inhérentes entre les technologies, il est recommandé aux utilisateurs de réaliser des études de corrélation entre les méthodes dans leur laboratoire avant de passer d'une technologie à une autre afin de déterminer les différences de technologie.
9. Les effets des autres variables potentielles, comme les variables relatives à la fixation de l'échantillon, n'ont pas été évalués.
10. Bien qu'il s'agisse d'un cas rare, des mutations à l'intérieur des régions de l'ADN génomique du gène BRAF couvert par les amorces et/ou les sondes du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 peuvent entraîner l'échec de la détection de la présence d'une mutation.
11. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut entraîner des faux négatifs ou des résultats non valides.
12. Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 montre une réactivité croisée limitée avec les échantillons de mutant non V600E (V600K, V600D et V600E2), ce qui entraîne des faux positifs. Veuillez vous reporter à la section « Évaluation de la performance non clinique » pour obtenir de plus amples renseignements.
13. La mélanine est un inhibiteur connu des réactions PCR. La trousse de préparation de l'échantillon d'ADN élimine la mélanine de l'échantillon lors de l'extraction; cependant, la mélanine dans un échantillon pourrait quand même entraîner des résultats non valides. Si l'on soupçonne une inhibition de la mélanine, il est suggéré de répéter l'analyse avec une dilution au 1:2, tel que décrit à la section Réanalyse des échantillons présentant des résultats invalides.

## ÉVALUATION DE LA PERFORMANCE NON CLINIQUE

### Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a été étudiée à l'aide de panels de dilution préparés à partir de trois types d'échantillons :

- Mélanges d'échantillons préparés en mélangeant des stocks d'ADN obtenus à partir d'échantillons de tissu FFPE de mutant BRAF V600E et d'échantillons de tissu FFPE de BRAF de type sauvage.
- Échantillons de tissu FFPE individuels préparés à partir de stocks d'ADN provenant de trois échantillons de mutant BRAF V600E.
- Mélange de lignées cellulaires préparées en mélangeant des stocks d'ADN obtenus à partir de lignées cellulaires de mutant BRAF V600E et de lignées cellulaires BRAF de type sauvage.

Tous les échantillons utilisés dans cette étude ont été séquencés par un séquençage 454 afin de déterminer le pourcentage de mutation de chaque échantillon.

### Sensibilité analytique sur des mélanges d'échantillons

Les extraits d'ADN d'échantillons de tissu FFPE de mutant BRAF V600E ont été mélangés à des extraits d'échantillons de tissu FFPE de BRAF de type sauvage afin d'obtenir un échantillon à ~10 %, trois échantillons à ~5 %, un échantillon à ~2,5 % de taux de mutation et un échantillon BRAF de type sauvage. Après le mélange, les taux de mutation ont été vérifiés par séquençage 454. Chacun des cinq mélanges d'échantillons contenant une mutation V600E (mais sans échantillon de type sauvage) a été dilué afin de produire les membres du panel détaillés au tableau 3.

Tableau 3  
Préparation des membres du panel de dilution à partir des mélanges d'échantillons

Mélange	% moyen de mutation*	Quantité d'ADN dans les membres du panel de dilution (ng/25 µL)**
Mélange à 10 %	9,1 % (n = 6)	125; 62,5; 31,3
Mélange 1 à 5 %	4,6 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mélange 2 à 5 %	5,1 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mélange 3 à 5 %	5,5 % (n = 5)	125; 5; 2,5; 1,3; 0,6; 0,3
Mélange à 2,5 %	3,1 % (n = 5)	125; 62,5; 31,3
0 % (type sauvage uniquement)	- - -	125

\* Pourcentage moyen de mutation du mélange, testé par séquençage 454

\*\* Quantité d'ADN génomique contenue dans chaque membre du panel. Le volume d'échantillon du test est de 25 µL.

Huit (8) réplicats de chaque membre du panel ont été analysés sur chacun des 3 lots de trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (n = 24/membre du panel). Le tableau 4 montre la sensibilité de chaque mélange de tissu FFPE, déterminée par la plus faible quantité d'ADN ayant donné un taux d'au moins 95 % de résultat BRAF V600E « Mutation Detected » (lignes grisées).

Tableau 4  
Sensibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 sur des mélanges de tissu FFPE

Mélange de tissu FFPE	Pourcentage de mutation par séquençage 454	Quantité d'ADN dans le membre du panel	Taux de « Mutation Detected » (n = 24)
Mélange de tissu FFPE à 10 %	9,1 %	125,0 ng/25 µL	100 %
		62,5 ng/25 µL	100 %
		31,3 ng/25 µL	100 %
Mélange 1 de tissu FFPE à 5 %	4,6 %	125,0 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 %
Mélange 2 de tissu FFPE à 5 %	5,1 %	125,0 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 %
Mélange 3 de tissu FFPE à 5 %	5,5 %	125,0 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 %
Mélange de tissu FFPE à 2,5 %	3,1 %	125,0 ng/25 µL	0 %
		62,5 ng/25 µL	4 %
		31,3 ng/25 µL	4 %
0 % (type sauvage)	- - -	125,0 ng/25 µL	0 %

Cette étude démontre que le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 peut détecter la mutation BRAF V600E à un taux de mutation  $\geq 5$  % sur une concentration standard de 125 ng/25 µL. La capacité du test à détecter la mutation à des concentrations d'ADN inférieures démontre que les échantillons peuvent contenir de l'ADN dégradé provenant du processus de fixation, sans pour autant empêcher la détection. Tous les résultats de test obtenus pour les échantillons BRAF de type sauvage étaient « Mutation Not Detected ».

## Sensibilité analytique avec des échantillons de tissu FFPE

Quarante-huit sections individuelles de 5 µm provenant de chacun des 3 échantillons de tissu FFPE de mutant BRAF V600E et contenant des taux de mutation de 6,1 %, 11,5 % et 4,4 % ont été traitées individuellement à l'aide de 3 lots de trousse de préparation des échantillons d'ADN cobas® afin d'isoler l'ADN. Des dilutions de l'ADN de chaque section ont été préparées afin de produire les membres du panel détaillés au tableau 5.

Tableau 5  
Préparation des membres du panel de dilution à partir d'échantillons de tissu FFPE

Échantillon de tissu FFPE	Information sur l'échantillon		Quantité d'ADN dans les membres du panel de dilution (ng/25 µL)
	% moyen de mutation V600E*	Pigmentation	
Échantillon 1	6,1 %	Fortement pigmenté**	125,0; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0
Échantillon 2	11,5 %	NHP***	125,0; 7,8; 3,9; 2; 1; 0,5
Échantillon 3	4,4 %	NHP	125,0; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0

\* Pourcentage moyen de mutation de l'échantillon, déterminé par séquençage 454

\*\* Pigmentation élevée fondée sur une évaluation visuelle, concentration en mélanine = 0,17 µL/25 µL

\*\*\* NHP = Not Highly Pigmented (pigmentation non élevée), selon évaluation visuelle

Seize (16) répliqués de chaque membres du panel ont été analysés chacun sur 3 lots de trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (n = 48/membre du panel). La sensibilité de chaque échantillon de tissu FFPE a été déterminée par la plus faible quantité d'ADN ayant donné un taux d'au moins 95 % de résultat BRAF V600E « Mutation Detected » (lignes grisées). Les résultats de l'étude sont présentés au tableau 6.

Tableau 6  
Sensibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 avec des échantillons de tissu FFPE

Échantillon de tissu FFPE	Pourcentage de mutation par séquençage 454	Quantité d'ADN dans le membre du panel	Taux de « Mutation Detected » (n = 48)
Échantillon 1	6,1 %	125,0 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 %
Échantillon 2	11,5 %	125,0 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 %
Échantillon 3	4,4 %	125,0 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 %

Cette étude démontre que le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 peut détecter la mutation BRAF V600E dans des échantillons de tissu FFPE réels à un taux de mutation ≥ 5 % sur une concentration standard de 125 ng/25 µL. La capacité du test à détecter la mutation à des concentrations d'ADN inférieures démontre que les échantillons peuvent contenir de l'ADN dégradé provenant du processus de fixation, sans pour autant empêcher la détection. Un échantillon fortement pigmenté était inclus dans l'étude et ne semble pas avoir affecté la sensibilité du test.



#### Sensibilité analytique avec un mélange de lignées cellulaires

Deux extraits d'ADN de lignées cellulaires de mélanome [SK-MEL 28 (mutant BRAF V600E) et SK-MEL 2 (BRAF de type sauvage)] ont été mélangés pour obtenir un échantillon ayant un taux de mutation de 4,5 %, vérifié par séquençage 454. Trois panels de dilution séparés contenant de 125 ng/25 µL à 0 ng/25 µL d'ADN ont été préparés. Vingt (20) réplicats de chaque membre du panel ont été testés, à l'aide de chacun des 3 lots de trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (60 réplicats au total). La sensibilité a été déterminée par la plus faible quantité d'ADN ayant donné un taux d'au moins 95 % de résultat BRAF V600E « Mutation Detected » (ligne grisée). Les résultats de l'étude sont présentés au tableau 7.

Tableau 7

Sensibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 avec un mélange de lignées cellulaires

Mélange de lignées cellulaires	Pourcentage moyen de mutation par séquençage 454	Quantité d'ADN dans le membre du panel	Taux de « Mutation Detected » (n = 60)
Mélange de lignées cellulaires	4,5 %	125,0 ng/25 µL	97 %
		31,3 ng/25 µL	100 %
		15,6ng/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 %

Le test a donné un taux de 95 % de résultat « Mutation Detected » à 3,9 ng/25 µL (dilution au 1:32, de la concentration d'ADN recommandée de 125 ng/25 µL). Cela indiquerait que le test pourra détecter la mutation BRAF V600E lorsque ~97 % de l'ADN est dégradé en raison du processus de fixation, en supposant que l'ADN de la lignée cellulaire était 100 % intact et amplifiable.

#### Contenu tumoral minimal

Trente-trois (33) échantillons du gène mutant BRAF V600E, 24 échantillons du gène BRAF de type sauvage et 17 échantillons du gène BRAF V600E non mutant (tableau 8) ont été testés afin de déterminer la sensibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 pour la détection de la mutation BRAF V600E dans des échantillons présentant un contenu tumoral allant de 5 à 50 %, sans macrodissection. Une (1) section de chaque échantillon a été testée à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a détecté tous les échantillons de BRAF V600E mutant ayant un contenu tumoral d'au moins 15 % et un pourcentage de mutation d'au moins 2,3 % (tableau 8).

Tableau 8  
 Résultats de l'analyse de 33 échantillons de BRAF V600E présentant différents pourcentages de contenu tumoral et différents pourcentages de mutation

Numéro de l'échantillon	Contenu tumoral*	% de mutation	Résultat du test
1	5 % / 5 %	2,8 %	Mutation Not Detected
2	5 % / 5 %	4,7 %	Mutation Not Detected
3	5 % / 5 %	1,1 %	Mutation Not Detected
4	10 % / 10 %	4,3 %	Mutation Not Detected
5	10 % / 10 %	13,9 %	Mutation Detected
6	15 % / 10 %	6,3 %	Mutation Detected
7	15 % / 15 %	22,7 %	Mutation Detected
8	15 % / 15 %	3,3 %	Mutation Detected
9	15 % / 15 %	28,9 %	Mutation Detected
10	15 % / 15 %	13,8 %	Mutation Detected
11	15 % / 15 %	13,9 %	Mutation Detected
12	15 % / 20 %	5,2 %	Mutation Detected
13	20 % / 20 %	28,0 %	Mutation Detected
14	20 % / 20 %	2,3 %	Mutation Detected
15	25 % / 20 %	12,8 %	Mutation Detected
16	25 % / 25 %	25,3 %	Mutation Detected
17	30 % / 25 %	19,5 %	Mutation Detected
18	30 % / 30 %	9,9 %	Mutation Detected
19	30 % / 35 %	4,4 %	Mutation Detected
20	30 % / 35 %	17,2 %	Mutation Detected
21	35 % / 30 %	8,1 %	Mutation Detected
22	35 % / 35 %	7,2 %	Mutation Detected
23	35 % / 35 %	11,5 %	Mutation Detected
24	35 % / 35 %	21,5 %	Mutation Detected
25	35 % / 40 %	36,3 %	Mutation Detected
26	40 % / 35 %	6,5 %	Mutation Detected
27	40 % / 35 %	11,6 %	Mutation Detected
28	40 % / 40 %	14,1 %	Mutation Detected
29	40 % / 40 %	20,9 %	Mutation Detected
30	40 % / 40 %	28,0 %	Mutation Detected
31	40 % / 45 %	35,8 %	Mutation Detected
32	45 % / 45 %	9,8 %	Mutation Detected
33	50 % / 40 %	7,9 %	Mutation Detected

\* Le contenu tumoral de l'échantillon a été évalué au moyen d'un examen effectué par un anatomopathologiste sur la première et la dernière des douze sections de 5 µm adjacentes de chaque échantillon. Le contenu tumoral de la première et de la dernière section est indiqué (p. ex., 95 % / 95 %).

Des résultats « Mutation Not Detected » ont été obtenus sur la totalité des 24 échantillons BRAF de type sauvage testés, avec un contenu tumoral allant de moins de 1 % à 50 %.

Une réactivité croisée a été observée avec deux échantillons de BRAF V600K mutant et un échantillon de BRAF V600D mutant. Des résultats « Mutation Not Detected » ont été obtenus sur les 13 autres échantillons BRAF V600K et sur un seul échantillon BRAF V600R mutant avec un contenu tumoral allant de 5 à 45 %.

### Corrélation avec une méthode de référence

Deux cent dix-neuf (219) échantillons de tissu FFPE de mélanome ont été testés à l'aide de 2 lots de la trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. Les échantillons qui présentaient un contenu tumoral inférieur à 50 % ont subi une macro-dissection. Les tests de comparaison par séquençage bidirectionnel Sanger (2X) ont été effectués sur tous les échantillons. Les résultats discordants entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le test de séquençage bidirectionnel Sanger (2X) ont été résolus par un séquençage 454.

### Résultats du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et du séquençage bidirectionnel Sanger (2X)

Les informations sur les échantillons et les résultats du séquençage bidirectionnel Sanger (2X) pour les 219 échantillons sont résumés au tableau 9, qui indique le stade tumoral en fonction du séquençage Sanger, ainsi qu'au tableau 10, qui montre le pourcentage de contenu tumoral en fonction du séquençage Sanger. Quarante-neuf (99) des 219 échantillons contenaient du BRAF V600E mutant, alors que 120 des échantillons contenaient soit du BRAF de type sauvage, soit du BRAF V600E non mutant d'après le séquençage Sanger.

Tableau 9  
Stade tumoral en fonction du séquençage Sanger

Stade tumoral	Résultats du séquençage bidirectionnel Sanger (2X)				Total	% du total
	V600E	Type sauvage	V600K	V600R		
Stade I	0	1	0	0	1	0,5 %
Stade II	7	11	3	1	22	10,0 %
Stade III	25	27	1	0	53	24,2 %
Stade IV	67	67	9	0	143	65,3 %
Total	99	106	13	1	219	100,0 %

Tableau 10  
% du contenu tumoral en fonction du séquençage Sanger

% du contenu tumoral	Résultats du séquençage bidirectionnel Sanger (2X)				Total	% du total
	V600E	Type sauvage	V600K	V600R		
< 50 %	16	26	2	0	44	20,1 %
> 50 %	83	80	11	1	175	79,9 %
Total	99	106	13	1	219	100,0 %

Les résultats obtenus lors de l'analyse des 219 échantillons tumoraux à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 par rapport aux résultats obtenus à l'aide du séquençage bidirectionnel Sanger (2X) sont indiqués au tableau 11 pour le premier lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et au tableau 12 pour le deuxième lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

Tableau 11  
Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (premier lot) en fonction du séquençage bidirectionnel Sanger (2X)

Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600	Séquençage bidirectionnel Sanger (2X)		
	Mutant (V600E)	Type sauvage ou V600E non mutant	Total
Mutation Detected (V600E)	94	19	113
Mutation Not Detected	5	101	106
Total	99	120	219

% de corrélation positive : 95 % (IC à 95 % : 89 à 98 %)

% de corrélation négative : 84 % (IC à 95 % : 77 à 90 %)

% de corrélation totale : 89 % (IC à 95 % : 84 à 93 %)

Tableau 12  
Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (deuxième lot) en fonction du séquençage bidirectionnel Sanger (2X)

Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600	Séquençage de l'ADN bidirectionnel Sanger		
	Mutant (V600E)	Type sauvage ou V600E non mutant	Total
Mutation Detected (V600E)	95	25	120
Mutation Not Detected	4	95	99
Total	99	120	219

% de corrélation positive : 96 % (IC à 95 % : 90 à 98 %)

% de corrélation négative : 79 % (IC à 95 % : 71 à 85 %)

% de corrélation totale : 87 % (IC à 95 % : 82 à 91 %)

La concordance totale entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage bidirectionnel Sanger (2X) était de 89 % pour le premier lot de réactifs (au total 24 résultats discordants) et de 87 % pour le deuxième lot (au total 29 échantillons discordants). Les résultats d'échantillons discordants ont été résolus à l'aide du séquençage 454.

Analyse des échantillons discordants par séquençage 454

Les résultats discordants entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage bidirectionnel Sanger (2X) ont été résolus par séquençage 454 et sont indiqués au tableau 13 pour le premier lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et au tableau 14 pour le deuxième lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

Tableau 13  
Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (premier lot) en fonction du séquençage bidirectionnel Sanger (2X),  
résolus par séquençage 454

Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600	Séquençage Sanger, résolu par séquençage 454		
	Mutant (V600E)	Type sauvage ou V600E non mutant	Total
Mutation Detected (V600E)	108	5	113
Mutation Not Detected	0	106	106
Total	108	111	219

% de corrélation positive : 100 % (IC à 95 % : 97 à 100 %)

% de corrélation négative : 95 % (IC à 95 % : 90 à 98 %)

% de corrélation totale : 98 % (IC à 95 % : 95 à 99 %)

Tableau 14  
Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (deuxième lot) en fonction du séquençage bidirectionnel Sanger (2X),  
résolus par séquençage 454

Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600	Séquençage Sanger, résolu par séquençage 454		
	Mutant (V600E)	Type sauvage ou V600E non mutant	Total
Mutation Detected (V600E)	109	11	120
Mutation Not Detected	0	99	99
Total	109	110	219

% de corrélation positive : 100 % (IC à 95 % : 97 à 100 %)

% de corrélation négative : 90 % (IC à 95 % : 83 à 94 %)

% de corrélation totale : 95 % (IC à 95 % : 91 à 97 %)

Une fois les échantillons discordants entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage bidirectionnel Sanger (2X) résolus par séquençage 454, la concordance totale a été améliorée, pour donner 98 % et 95 % pour le premier et le deuxième lot, respectivement.

### Spécificité

La spécificité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a été déterminée en testant 219 échantillons de tissu FFPE de mélanome en conjonction avec l'étude de corrélation avec une méthode de référence.

### Séquençage Sanger

La spécificité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a été calculée en déterminant le pourcentage d'échantillons de tissu FFPE identifiés en tant que BRAF de type sauvage par le séquençage bidirectionnel Sanger (2X) et correctement identifiés en tant que BRAF de type sauvage par le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (% de corrélation négative).

La spécificité (% de corrélation négative) obtenue lors de l'analyse des 219 échantillons tumoraux à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 par rapport aux résultats obtenus à l'aide du séquençage bidirectionnel Sanger (2X) était de 84 % (tableau 11) en utilisant le premier lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et de 79 % (tableau 12) pour le deuxième lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

### Analyse des échantillons discordants par séquençage 454

La spécificité a été améliorée pour donner 95 % pour le premier lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (tableau 13) et 90 % pour le deuxième lot de réactifs du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (tableau 14) après utilisation du séquençage 454 pour résoudre les résultats discordants entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage de l'ADN bidirectionnel Sanger (2X).

L'amélioration de la spécificité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 après la résolution par séquençage de l'ADN 454 était principalement due à la capacité du séquençage de l'ADN 454 à détecter les mutations BRAF V600E n'ayant pas été détectées par le séquençage Sanger en raison des faibles pourcentages de mutation observés pour ces échantillons et de la faible sensibilité du séquençage Sanger comparé au séquençage 454.

La différence de spécificité entre les deux lots de trousse de test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (95 % par rapport à 90 %) était principalement due à la différence de détection des échantillons de BRAF V600K mutant avec un % de mutation proche du seuil de détection du BRAF V600K mutant, soit environ 35 %.

### Réactivité croisée

La réactivité croisée du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a été évaluée en analysant les études suivantes :

- Échantillons de tissu FFPE de mélanome BRAF non V600E avec différents pourcentages de mutation
- Plasmides BRAF non V600E
- Plasmides homologues du BRAF
- Microorganismes cutanés

La réactivité croisée a également été évaluée en déterminant si la présence de plasmides homologues du BRAF ou de microorganismes cutanés interférait dans la détection de la mutation BRAF V600E.

### Échantillons de tissu FFPE BRAF non V600E avec différents pourcentages de mutation

Quatorze (14) échantillons de tissu FFPE de mélanome BRAF mutant non V600E (V600D, V600E2, V600R ou V600K) ont été analysés avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. Les trois répliqués des huit échantillons BRAF non V600E ont montré une réactivité croisée avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. Les faux positifs obtenus pour ces répliqués provenaient d'échantillons de BRAF V600D mutant (17,7 % de mutation), de BRAF V600E2 mutant (68,0 % de mutation) ou de BRAF V600K mutant (taux de mutation supérieur à 30 %). Aucune réactivité croisée n'a été observée pour l'échantillon de BRAF V600R mutant (mutation 23,1 %) (tableau 15).

Tableau 15  
Taux de « Mutation Detected » observés à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 pour les mutations BRAF Non V600E

Numéro de l'échantillon	État de la mutation BRAF	Pourcentage de mutation	Contenu tumoral*	Stade tumoral	Taux de « Mutation Detected » (n = 3)
1	V600D	17,7 %	30 % / 30 %	IV	100 %
2	V600E2	15,9 %	75 % / 75 %	IV	0 %
3		36,1 %	75 % / 80 %	III	0 %
4		68,0 %	75 % / 75 %	IV	100 %
5	V600R	23,1 %	15 % / 15 %	IV	0 %
6	V600K	16,5 %	25 % / 25 %	III	0 %
7		21,5 %	35 % / 40 %	IV	0 %
8		22,7 %	40 % / 40 %	IV	0 %
9		31,4 %	60 % / 60 %	IV	100 %
10		34,6 %	75 % / 75 %	IV	100 %
11		39,3 %	80 % / 80 %	IV	100 %
12		36,1 %	95 % / 95 %	IIC	100 %
13		61,7 %	75 % / 75 %	IV	100 %
14		68,8 %	80 % / 80 %	IV	100 %

\* Le contenu tumoral de l'échantillon a été évalué au moyen d'un examen effectué par un anatomopathologiste sur la première et la dernière des douze sections de 5 µm adjacentes de chaque échantillon. Le contenu tumoral de la première et de la dernière section est indiqué (p. ex., 95 % / 95 %).

Un panel de dilution de onze membres présentant des concentrations d'ADN allant de 5,0 à 0,0049 ng/µL (soit entre 125 et 0,1 ng d'ADN dans le volume de 25 µL utilisé pour le test) a été préparé et chaque membre du panel a été testé en triple afin de déterminer la plus faible quantité d'ADN ayant donné un taux de 100 % de résultat « Mutation Detected » pour les huit échantillons présentant une réaction croisée avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. La plus faible quantité d'ADN avant la perte de réactivité croisée de l'échantillon a été observée entre 0,5 ng/25 µL pour un échantillon de BRAF V600K mutant avec un taux de mutation de 68,8 % et 15,6 ng/25 µL pour un échantillon de BRAF V600D mutant avec un taux de mutation de 17,7 % (tableau 16).

Tableau 16  
Plus faible concentration d'ADN donnant un résultat « Mutation Detected » au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 permettant de détecter une réactivité croisée

Numéro de l'échantillon	État de la mutation BRAF	Pourcentage de mutation	Plus faible quantité d'ADN avant la perte de la réactivité croisée (n = 3)
1	V600D	17,7 %	15,6 ng/25 µL
2	V600E2	68,0 %	7,8 ng/25 µL
3	V600K	31,4 %	3,9 ng/25 µL
4		34,6 %	3,9 ng/25 µL
5		39,3 %	3,9 ng/25 µL
6		36,1 %	2,0 ng/25 µL
7		61,7 %	3,9 ng/25 µL
8		68,8 %	0,5 ng/25 µL

#### Plasmides BRAF non V600E

Des panels de dilution de plasmides, avec un pourcentage de mutation allant de 5 à 75 % dans un arrière-plan de plasmide de type sauvage, ont été préparés pour les neuf mutations BRAF non V600E suivantes : D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K et V600R. Trois réplicats de chacun des membres des dix panels de dilution de plasmides ont été analysés à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600. Une réactivité croisée a été observée dans les 3 réplicats pour le plasmide BRAF V600D à un taux de mutation ≥ 10 %, pour le plasmide BRAF V600K à un taux de mutation ≥ 35 % et pour le plasmide BRAF V600E2 à un taux de mutation ≥ 65 %. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec des plasmides pour les autres mutations BRAF testées.

## Plasmides homologues du BRAF

Les échantillons ont été préparés pour trois plasmides homologues du BRAF (pseudogène de BRAF, ARAF et RAF1), plasmide BRAF V600E mutant et plasmide BRAF de type sauvage comme mentionné au tableau 17. De trois à six répliquats de chaque membre de panel ont été analysés à l'aide du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600.

Tableau 17  
Échantillons de plasmides homologues du BRAF

Panel		Composition en volume	
Nom	Membre	Composant 1	Composant 2
Pseudogène BRAF	1	95 % de pseudogène BRAF	5 % de BRAF V600E Mutant
	2	100 % de pseudogène BRAF	- - -
ARAF	1	95 % d'ARAF	5 % de BRAF V600E Mutant
	2	100 % d'ARAF	- - -
RAF1	1	95 % de RAF1	5 % de BRAF V600E Mutant
	2	100 % de RAF1	- - -
Témoin	1	95 % de BRAF de type sauvage	5 % de BRAF V600E Mutant
	2	100 % de BRAF de type sauvage	- - -
	3	95 % de tampon d'éluion de l'ADN	5 % de BRAF V600E Mutant

Aucun des trois plasmides homologues du BRAF testés n'a été détecté par le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 lorsqu'il était testé seul, ce qui indique que les plasmides homologues du BRAF n'ont pas de réaction croisée avec le test.

Le plasmide BRAF V600E mutant à 5 % en présence de 95 % de plasmides homologues du BRAF a donné un résultat «Mutation Detected», ce qui indique qu'il n'y a eu aucune interférence des plasmides homologues dans la détection de la mutation BRAF V600E.

### Microorganismes cutanés

Les microorganismes cutanés suivants n'ont pas montré de réaction croisée dans le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 lorsqu'ils étaient ajoutés à un échantillon de type sauvage à  $1 \times 10^6$  unités formatrices de colonies au cours de l'étape de lyse tissulaire :

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

Les microorganismes testés n'ont pas non plus montré d'interférence avec la détection de la mutation BRAF V600E lorsque  $1 \times 10^6$  unités formatrices de colonies étaient ajoutées au cours de l'étape de lyse tissulaire d'un échantillon contenant un faible taux (7,6 %) de mutation BRAF V600E.

### Interférence

Les triglycérides ( $\leq 74$  mM, 2 x la concentration élevée recommandée par le CLSI<sup>10</sup>), l'hémoglobine ( $\leq 2$  mg/mL, 1 x la concentration élevée recommandée par le CLSI<sup>10</sup>), les tissus nécrotiques  $\leq 95$  % et la mélanine de synthèse ( $\leq 4$  µg/mL) n'ont pas montré d'interférence avec le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 lorsque la substance potentiellement interférente était ajoutée à l'étape de lyse de la procédure de préparation des échantillons.

## PERFORMANCES CLINIQUES

### Reproductibilité

Une étude a été menée pour évaluer la reproductibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 sur 3 sites d'analyse externes (2 opérateurs par site), 3 lots de réactifs et 5 jours d'analyse non consécutifs avec un panel de 8 membres d'échantillons d'ADN provenant de sections de tissu FFPE de mélanome malin. Ce panel comprenait à la fois des échantillons pigmentés et non pigmentés et une plage de pourcentages de contenu tumoral et de pourcentages d'allèles mutants, y compris un échantillon à la limite de détection (LOD) de 5 %. Au total 92 des 94 cycles d'analyse (97,9 %) étaient valides. Sur les 1442 échantillons testés, 2 (0,14 %) ont donné des résultats non valides. Pour tous les membres de panel à l'exception des échantillons LOD, des résultats corrects ont été enregistrés pour 100 % des tests valides, y compris les membres de panel d'échantillons présentant un taux de mutation de 20 % et deux membres de panel identifiés comme étant fortement pigmentés. Pour le membre de panel LOD, la mutation V600E a été détectée dans 90 % (162/180) des échantillons. Aucun faux positif n'a été enregistré pour les échantillons WT testés. Pour résumer, le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 s'est avéré hautement reproductible à la fois dans les échantillons pigmentés et non pigmentés, dans les échantillons présentant un faible contenu tumoral et un faible pourcentage d'allèles mutants et pour tous les sites d'analyse, opérateurs, lots de réactifs et jours d'analyse. La spécificité analytique était de 100 %.

### Étude d'utilité clinique

Une étude clinique a été menée pour évaluer le pourcentage de corrélation positive et négative du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 avec le séquençage bidirectionnel 2X de Sanger comme méthode de référence pour la détection des mutations dans le codon 600 du proto-oncogène BRAF. Des échantillons de tissu mélanomateux humain fixé à la formaline et enrobé de paraffine ont été obtenus d'une cohorte de patients ayant subi un dépistage séquentiel dans le cadre d'essais cliniques de phase II et III sur le vémurafénib. Le principal objectif était d'évaluer la corrélation entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage de Sanger pour la détection de la mutation canonique V600E (1799 T>A).

Caractéristiques démographiques et cliniques : Les caractéristiques démographiques des patients de cette études montrent que l'âge, le sexe et l'origine ethnique des patients ayant participé aux essais de phases II et III étaient semblables, et elles étaient comparables aux données démographiques des patients d'autres essais cliniques de grande envergure menés sur le traitement à action générale dans le mélanome au stade avancé<sup>11,12</sup>.

Patients/échantillons admissibles et évaluables : On a obtenu un résultat valide au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 pour les 477 patients admissibles dans cette cohorte. Le séquençage de Sanger n'a pas donné de résultat valide dans 9,2 % des échantillons (44/477). Par conséquent, 433 échantillons étaient considérés comme évaluables, c.-à-d. que chacun avait un résultat valide au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et un résultat valide au séquençage de Sanger.

Tableau 18  
Comparaison principale du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et du séquençage bidirectionnel 2X de Sanger pour les échantillons évaluables

Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 (méthode de test)	Séquençage de Sanger (méthode de référence)		
	Mutation BRAF V600E détectée <sup>a</sup>	Mutation BRAF V600E non détectée <sup>b</sup>	Total
Mutation Detected	215	42	257
Mutation Not Detected	8	168	176
Total	223 (51,5 %)	210 (48,5 %)	433
Pourcentage de corrélation positif (IC à 95 %)	100 % x 215/223 = 96,4 % (93,1 % - 98,2 %)		
Pourcentage de corrélation négative (IC à 95 %)	100 % x 168/210 = 80,0 % (74,1 % - 84,8 %)		
Pourcentage de corrélation globale (IC à 95 %)	100 % x 383/433 = 88,5 % (85,1 % - 91,1 %)		

PCP = pourcentage de corrélation positive; PCN = pourcentage de corrélation négative; PCG = pourcentage de corrélation globale.

- « Mutation Detected » indique la présence du type de mutation BRAF prédominant, V600E (substitution mononucléotidique : 1799 T>A), tel qu'identifié par le séquençage bidirectionnel de Sanger.
- « Mutation Not Detected » indique l'absence du type de mutation BRAF prédominant, V600E, tel qu'identifié par le séquençage bidirectionnel de Sanger (c.-à-d. que le résultat de Sanger était de type sauvage ou aucune mutation, V600D, « V600E2 », V600K et V600R).

Remarque : les échantillons de mélanome présentant des résultats valides par paire, à la fois avec le test de mutation cobas 4800 BRAF V600 et le séquençage Sanger ont été considérés évaluables.

Remarque : IC = (résultat) intervalle de confiance.



Corrélation entre le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et le séquençage bidirectionnel 2X de Sanger dans la détection des mutations BRAF V600E

Comme le montre le tableau 16 ci-dessus, le pourcentage de corrélation positive (PCP) avec le séquençage de Sanger était de 96,4 % (215/223) et le pourcentage de corrélation négative (PCN), de 80 % (168/210), avec un pourcentage de corrélation globale de 88,5 %. Cette étude avait pour objectif secondaire d'évaluer tous les résultats discordants, ainsi qu'un sous-groupe aléatoire de résultats concordants, en utilisant le séquençage 454 comme méthode indépendante de détection des mutations. Le tableau 19, ci-dessous, montre les résultats de cette analyse.

Tableau 19  
Résultats du séquençage 454 comparativement à ceux du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et du séquençage de Sanger

Comparaison originale		Méthode de résolution		Total
Test de mutation cobas® 4800 BRAF V600	Séquençage bidirectionnel 2X de Sanger (méthode de référence)	Mutation détectée au séquençage 454 <sup>a</sup>	Mutation non détectée au séquençage 454 <sup>b</sup>	
Mutation Detected	Mutation Detected <sup>a</sup>	39	0	39
	Mutation Not Detected <sup>b</sup>	17	25	42
Mutation Not Detected	Mutation Detected <sup>a</sup>	3	5	8
	Mutation Not Detected <sup>b</sup>	3	52	55
Total		62	82	144

- « Mutation Detected » indique la présence du type de mutation BRAF prédominant, V600E (substitution mononucléotidique : 1799 T>A), tel qu'identifié par la méthode de séquençage spécifique.
- « Mutation Not Detected » indique l'absence du type de mutation BRAF prédominant, V600E, tel qu'identifié par la méthode de séquençage spécifique (c.-à-d. que le résultat était de type sauvage ou aucune mutation V600D, « V600E2 », V600K et V600R).

On a observé 50 échantillons discordants. Pour les 8 échantillons discordants ayant obtenu un résultat « Mutation Not Detected » au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et un résultat « Mutation Detected » au séquençage de Sanger, les résultats au séquençage 454 étaient « type sauvage » dans deux cas, « V600K » dans deux cas, « V600E2 » dans un cas et « V600E » dans trois cas. Ainsi, trois échantillons ont obtenu un résultat « Mutation Not Detected » au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600, mais ont obtenu un résultat positif pour V600E avec la méthode de référence et le séquençage 454.

Sur les 42 échantillons qui ont obtenu un résultat « Mutation Detected » au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 et « Mutation Not Detected » pour la mutation V600E au séquençage de Sanger, 17 ont obtenu un résultat positif pour V600E au séquençage 454. De plus, la mutation V600K a été détectée dans 24 échantillons au séquençage de Sanger et au séquençage 454. Pour un échantillon ayant obtenu un résultat positif au test de mutation cobas® 4800 BRAF V600, le séquençage de Sanger a montré une mutation rare au codon 600 (GAC).

Au total, 94 échantillons concordants ont été analysés par séquençage 454. La corrélation avec le séquençage 454 était de 100 % (39/39) pour les échantillons mutants concordants et de 94,5 % (52/55) pour les échantillons non mutants concordants.

Mutations non-V600E. Les résultats combinés du séquençage de Sanger et du séquençage 454 pour la population admissible (qui comprend 32 échantillons avec des résultats valides au séquençage 454 et des résultats invalides au séquençage de Sanger) ont permis d'identifier les mutations non-V600E suivantes : V600K, V600R et V600E2 (tableau 20 ci-dessous). Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a détecté la mutation chez 70 % des patients évaluables porteurs de mutations V600K tel que déterminé au séquençage de Sanger.

Tableau 20  
Prévalence des types de mutation BRAF V600 tel que déterminé par séquençage bidirectionnel 2X de Sanger ou par séquençage 454 dans la population évaluable

Séquence d'acide aminé (codon 600)	Séquence de nucléotides (1798-1800)	Fréquence, n (%) Globale
WT	GTG	146 (33,7 %)
V600E	GAG	236 (54,5 %)
V600K	AAG	36 (8,3 %)
V600R	AGG	7 (1,6 %)
V600E2	GAA	7 (1,6 %)
V600D	GAT	0 (0,0 %)
Autre	GAC	1 (0,2 %)
Total		433 (100,0 %)

En résumé, le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 a montré un fort pourcentage de corrélation positive avec le séquençage bidirectionnel 2X de Sanger (96,4 %) pour la détection des mutations V600E (1799 T>A). Le pourcentage plus bas de corrélation négative (80,0 %) était principalement attribuable à une plus grande sensibilité du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600E pour la détection des mutations V600E et à la réactivité croisée du test avec les mutations non-V600E (principalement V600K).

## Bibliographie

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-54.
2. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263–1284.
3. Flaherty K.T., et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2010; vol. 363 no. 9: 809-819
4. Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics* 2003; 33:19-20.
5. COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>), Release 47 (May 2010)
6. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128.
7. Chosewood, L.C and Wilson, D.E. Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Fifth edition. (CDC) 21-1112. 2009
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005
9. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, Appendix D 2005
11. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10; 27(17):2823-2830.
12. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19; 363(8):711-723.

Information sur les révisions apportées au document	
Doc Rev. 3.0 07/2013	Les instructions de manipulation et de conservation des échantillons ont été mises à jour. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.
Doc Rev. 4.0 10/2013	Section Instruments et logiciel mise à jour. Ajout de « ou No Mutation Detected » comme type de résultat de test dans le Tableau 2 de la section INTERPRETATION DES RESULTATS. Mise à jour des descriptions de la page des symboles harmonisés à la fin de la notice. Retrait de la phrase « Tous droits réservés » du copyright. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.
Doc Rev. 5.0 11/2013	Remplacement de l'adresse américaine (RMS) du fabricant légal par l'adresse allemande (RDG). Veuillez contacter votre représentant local Roche si vous avez des questions.
Doc Rev. 6.0 07/2014	Les instructions de conservation et de manipulation des échantillons de la version Doc. Rev. 2.0 ont été rétablies. Veuillez communiquer avec le représentant de Roche de votre région si vous avez d'autres questions.

Fabriqué aux États-Unis



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics  
201, boulevard Armand-Frappier  
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877 273-3433)

Distributed by

COBAS, COBAS Z et AMPERASE sont des marques de commerce de Roche.

La technologie de prévention des interférences dans l'enzyme AmpErase est couverte par le brevet américain n° 5,035,996 et ses contreparties étrangères détenus par Invitrogen Corporation et utilisé sous licence par Roche Molecular Systems, Inc.

EPPENDORF est une marque de commerce d'Eppendorf AG.

PIPET-AID est une marque de commerce de Drummond Scientific.

NANODROP est une marque de commerce de Thermo Scientific.




















©2014 Roche Molecular Systems, Inc.

07/2014

Doc Rev. 6.0

06611818001-06FRC

Les symboles suivants sont désormais en usage pour l'étiquetage des produits diagnostiques par PCR de Roche.

	Logiciel auxiliaire		Code du lot
	Mandataire dans la Communauté européenne		Risques biologiques
	Fiche technique à codes-barres		Référence du catalogue
	Consulter les instructions d'utilisation		Pour évaluation de performance IVD uniquement
	Suffisant pour <n> tests		Limite inférieure de la plage assignée
	Contenu du kit		Fabricant
	Distributeur		Conserver dans un endroit sombre
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Limites de température
	Fichier de définition de tests		Utiliser jusqu'à
	Limite supérieure de la plage assignée		