

cobas[®]



Rx Only

cobas[®] **EGFR Mutation Test v2**

Para diagnóstico in vitro



cobas[®] **EGFR Mutation Test v2**

24 Tests P/N: 07248563190

Para las muestras FFPE, consulte el **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) para la preparación de las muestras.

Para las muestras de plasma, consulte el **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) para la preparación de las muestras.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Uso previsto | 6 |
| Resumen y explicación de la prueba..... | 7 |
| Información de referencia..... | 7 |
| Principios del procedimiento | 9 |
| Preparación de las muestras..... | 9 |
| Amplificación mediante PCR..... | 9 |
| APARTADO A: PARA USO CON MUESTRAS DE TEJIDO | 11 |
| Materiales y reactivos..... | 11 |
| Materiales y reactivos suministrados..... | 11 |
| Almacenamiento y manipulación de los reactivos | 12 |
| Material adicional necesario | 13 |
| Equipos y programas necesarios pero no suministrados..... | 13 |
| Precauciones y requisitos de manipulación | 13 |
| Advertencias y precauciones..... | 13 |
| Buenas prácticas de laboratorio..... | 14 |
| Contaminación | 14 |
| Integridad | 14 |
| Eliminación de residuos | 15 |
| Limpieza de derrames..... | 15 |
| Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras..... | 15 |
| Recogida de muestras | 15 |
| Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras | 15 |
| Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas | 16 |
| Procedimiento analítico | 17 |
| Realización de la prueba..... | 17 |
| Instrucciones de uso | 17 |
| Tamaño de la serie..... | 17 |
| Control para todo el proceso | 17 |
| Aislamiento de ADN | 17 |
| Macrodissección..... | 18 |
| Cuantificación del ADN..... | 18 |
| Amplificación y detección..... | 18 |
| Configuración del equipo..... | 19 |
| Configuración de las peticiones de pruebas | 19 |
| Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra | 20 |
| Dilución de muestras | 20 |

| | |
|--|-----------|
| Configuración de las reacciones..... | 21 |
| Inicio de la PCR..... | 22 |
| Resultados..... | 23 |
| Interpretación de los resultados..... | 23 |
| Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos..... | 23 |
| Control de calidad y validez de los resultados..... | 24 |
| Control de mutación..... | 24 |
| Control negativo..... | 24 |
| Limitaciones del procedimiento..... | 24 |
| Evaluación no clínica del rendimiento | 25 |
| Sensibilidad analítica – Límite de blanco..... | 25 |
| Límite de detección con mezclas de muestras de FFPET | 25 |
| Contenido tumoral mínimo | 27 |
| Reactividad cruzada con otras mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21..... | 28 |
| Muestras del ensayo clínico EURTAC | 28 |
| Muestras del ensayo clínico AURA2 | 28 |
| Especificidad – Microorganismos y homólogos de EGFR | 28 |
| Microorganismos pulmonares | 28 |
| Plásmidos de homólogos de EGFR..... | 28 |
| Interferencia..... | 29 |
| Tejido necrótico..... | 29 |
| Repetibilidad | 29 |
| Reproducibilidad de la manipulación de las muestras..... | 29 |
| Evaluación clínica del rendimiento | 30 |
| Estudio de reproducibilidad clínica 1 | 30 |
| Estudio de reproducibilidad clínica 2..... | 31 |
| Correlación con el método de referencia con muestras de la fase III del estudio EURTAC | 32 |
| Correlación con el método de referencia con muestras de fase II del estudio AURA2..... | 35 |
| Datos de los resultados clínicos..... | 36 |
| EURTAC..... | 36 |
| Estudio AURA2 | 37 |
| FLAURA..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| APARTADO B: PARA USO CON MUESTRAS DE PLASMA..... | 42 |
| Preparación de las muestras..... | 42 |
| Materiales y reactivos..... | 42 |
| Materiales y reactivos suministrados..... | 42 |
| Almacenamiento y manipulación de los reactivos | 43 |
| Material adicional necesario | 44 |
| Equipos y programas necesarios pero no suministrados..... | 44 |
| Precauciones y requisitos de manipulación | 44 |
| Advertencias y precauciones..... | 44 |
| Buenas prácticas de laboratorio..... | 45 |
| Contaminación | 45 |
| Integridad | 45 |
| Eliminación de residuos | 46 |
| Limpieza de derrames..... | 46 |
| Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras..... | 46 |
| Recogida y manipulación de muestras | 46 |
| Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras | 47 |
| Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas | 47 |
| Procedimiento analítico | 48 |
| Realización de la prueba..... | 48 |
| Instrucciones de uso | 48 |
| Tamaño de la serie..... | 48 |
| Control para todo el proceso | 48 |
| Aislamiento de ADN | 48 |
| Amplificación y detección..... | 49 |
| Configuración del equipo..... | 49 |
| Configuración de las peticiones de pruebas | 49 |
| Configuración de las reacciones..... | 50 |
| Inicio de la PCR..... | 51 |
| Resultados..... | 52 |
| Interpretación de los resultados | 52 |
| Índice semicuantitativo (SQI) | 52 |
| Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos..... | 53 |
| Control de calidad y validez de los resultados..... | 53 |
| Control de mutación..... | 53 |
| Control negativo..... | 53 |
| Limitaciones del procedimiento..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| Evaluación no clínica del rendimiento | 55 |
| Rendimiento analítico | 55 |
| Sensibilidad analítica – Límite de blanco..... | 55 |
| Límite de detección mediante ADN de línea celular..... | 55 |
| Reactividad cruzada con otras mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21..... | 56 |
| Muestras del ensayo clínico AURA2 y de la extensión de AURA..... | 56 |
| Especificidad – Microorganismos..... | 56 |
| Interferencia..... | 56 |
| Linealidad | 57 |
| Repetibilidad | 60 |
| Evaluación clínica del rendimiento | 61 |
| Reproducibilidad clínica con plasma recogido en K2 EDTA | 61 |
| Reproducibilidad clínica con plasma recogido en Roche cfDNA | 62 |
| Límite de detección (LoD) con muestras de plasma de CPCNP..... | 63 |
| Correlación de plasma recogido en Roche cfDNA con plasma recogido en K2 EDTA..... | 64 |
| Correlación con el método de referencia con muestras de plasma de fase III de la cohorte ASPIRATION | 65 |
| Correlación entre muestras de plasma y tejido según la prueba cobas EGFR para la detección de las mutaciones de delección del exón 19 y L858R mediante muestras de fase III de ENSURE..... | 66 |
| Correlación con el método de referencia con muestras de fase II del estudio AURA2..... | 67 |
| Correlación entre muestras de plasma y de tejido para la detección de T790M con muestras de fase II del estudio AURA2..... | 68 |
| Datos de los resultados clínicos..... | 69 |
| Estudio ENSURE..... | 69 |
| Estudio AURA2..... | 71 |
| FLAURA..... | 71 |
| Avisos de resultados | 75 |
| Explicación de los avisos de resultados | 75 |
| Información adicional | 78 |
| Símbolos | 78 |
| Asistencia técnica | 79 |
| Fabricante | 79 |
| Marcas registradas y patentes | 79 |
| Copyright..... | 79 |
| Bibliografía | 80 |
| Revisión del documento | 82 |

Uso previsto

La prueba **cobas**® EGFR Mutation Test v2 es una prueba de PCR a tiempo real para la detección cualitativa de mutaciones definidas del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). Las mutaciones de EGFR definidas se detectan mediante ADN aislado de tejido tumoral embebido en parafina y fijado en formalina (FFPET) o de ADN tumoral circulante libre (cfADN) obtenido a partir de plasma derivado de sangre total periférica anticoagulada en EDTA.

La prueba está diseñada como complemento diagnóstico para facilitar la selección de pacientes con CPCNP para el tratamiento con inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa del gen EGFR (incluidas las terapias dirigidas que se indican en la Tabla 1 que figura a continuación) conforme al etiquetado de productos terapéuticos aprobado:

Tabla 1

| Medicamento | FFPET | Plasma |
|-------------------------|---|---|
| TARCEVA® (erlotinib) | Deleciones en el exón 19 y L858R | Deleciones en el exón 19 y L858R |
| TAGRISSO® (osimertinib) | Deleciones en el exón 19, L858R y T790M | Deleciones en el exón 19, L858R y T790M |
| IRESSA® (gefitinib) | Deleciones en el exón 19 y L858R | Deleciones en el exón 19 y L858R |

El uso de muestras de plasma en la prueba es más apropiado para aquellos pacientes de los que no se puede obtener una biopsia tumoral. Los pacientes con resultados negativos para estas mutaciones obtenidos mediante la prueba realizada a partir de muestras de plasma deberían seguir el procedimiento rutinario de biopsia de tejido y análisis de las mutaciones en EGFR con un tipo de muestra FFPET, si se encuentra disponible.

No existen datos sobre la seguridad y la eficacia de los medicamentos para las siguientes mutaciones del gen EGFR detectadas por la prueba **cobas**® EGFR Mutation Test v2:

Tabla 2

| Medicamento | FFPET | Plasma |
|-------------------------|--|--|
| TARCEVA® (erlotinib) | G719X, inserciones en el exón 20, T790M, S768I y L861Q | G719X, inserciones en el exón 20, T790M, S768I y L861Q |
| TAGRISSO® (osimertinib) | G719X, inserciones en el exón 20, S768I y L861Q | G719X, inserciones en el exón 20, S768I y L861Q |
| IRESSA® (gefitinib) | G719X, inserciones en el exón 20, T790M, S768I y L861Q | G719X, inserciones en el exón 20, T790M, S768I y L861Q |

La prueba **cobas**® EGFR Mutation Test v2 para uso con plasma incluye una medición semicuantitativa de las mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR. Esta medición, presentada como índice semicuantitativo (SQI), se correlaciona con la cantidad de cfDNA mutado de la diana en el plasma y puede utilizarse para determinar los cambios en la carga de cfDNA mutado de la diana a lo largo del tiempo para un paciente determinado.

Para la preparación manual de muestras, las muestras FFPET se procesan mediante el **cobas**® DNA Sample Preparation Kit, mientras que las muestras de plasma se procesan mediante el **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit. El analizador **cobas z 480** se utiliza para los procesos de amplificación y detección automáticas.

Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia

Las mutaciones activadoras del gen codificador del EGFR se producen principalmente en presencia de CPCNP y su acción da lugar a la activación constitutiva de la actividad de la proteína cinasa del EGFR, lo que contribuye al proceso oncogénico.¹ La prevalencia de estas mutaciones en casos no seleccionados de CPCNP es de aproximadamente entre un 10 % y un 30 %.^{2,3} Sin embargo, estas mutaciones suelen producirse con mayor frecuencia, aunque no de manera exclusiva, en mujeres no fumadoras o fumadoras ocasionales de origen asiático y con histología de adenocarcinoma.⁴

Las mutaciones del gen EGFR más habituales en CPCNP incluyen varias deleciones en el exón 19 y la mutación por sustitución L858R en el exón 21; este conjunto de mutaciones constituye aproximadamente el 85 % de las mutaciones del gen EGFR observadas en pacientes con CPCNP.⁵ La prueba **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (prueba **cobas** EGFR) es un ensayo de PCR a tiempo real diseñado para detectar mutaciones por sustitución G719X en el exón 18, mutaciones por deleción en el exón 19, las mutaciones por sustitución T790M y S768I en el exón 20, mutaciones por inserción en el exón 20 y las mutaciones por sustitución L858R y L861Q en el exón 21.

La prueba **cobas** EGFR es una prueba de diagnóstico complementaria para TARCEVA® (erlotinib), un compuesto que inhibe de forma reversible la actividad de la cinasa en el gen EGFR para impedir que los residuos de autofosforilación de la tirosina se asocien al receptor, lo que aumenta la inhibición de la señalización descendente que promueve la supervivencia y proliferación de células. La afinidad de unión de TARCEVA® para las mutaciones por deleción del exón 19 o las mutaciones L858R del exón 21 del gen EGFR es superior a la afinidad del receptor no mutado.⁶ Los ensayos clínicos realizados han demostrado que los pacientes con CPCNP avanzado y mutaciones de deleción en el exón 19 o mutaciones de sustitución L858R en el exón 21 tratados con TARCEVA® como primera opción suelen experimentar beneficios clínicos en comparación con los pacientes a los que se les administra quimioterapia.^{3,7}

La prueba **cobas** EGFR se utiliza como prueba de diagnóstico complementaria para TAGRISSO® (osimertinib), un inhibidor irreversible tanto de las mutaciones de sensibilidad a la TKI como de resistencia T790M en EGFR en pacientes con CPCNP avanzado. TAGRISSO® inhibe la actividad de la cinasa en el EGFR, lo que a su vez inhibe una cascada de eventos de señalización intracelular descendente que promueven la proliferación, supervivencia y angiogénesis.⁸ Los ensayos clínicos han demostrado que los pacientes con CPCNP no escamoso avanzado que presentan una mutación de sensibilidad a los TKI en EGFR y cuya enfermedad haya empeorado cuando son tratados con una terapia TKI del EGFR de primera generación y que han desarrollado una mutación de resistencia T790M en el exón 20 cuando han recibido tratamiento con TAGRISSO® tienen posibilidades de experimentar beneficios clínicos.⁹ Un ensayo clínico de fase III demostró que los pacientes con CPCNP avanzado (deleción del exón 19 o mutación por sustitución L858R positiva del exón 21) que fueron tratados con TAGRISSO® como tratamiento de primera línea, obtuvieron un mayor beneficio clínico que los pacientes tratados con un TKI del EGFR de primera generación (gefitinib o erlotinib).¹⁰

La prueba **cobas** EGFR es una prueba de diagnóstico complementaria para IRESSA® (gefitinib), un compuesto que inhibe de forma reversible la actividad de la cinasa en el gen EGFR para impedir que los residuos de autofosforilación de la tirosina se asocien al receptor, lo que aumenta la inhibición de la señalización descendente que promueve la supervivencia y proliferación de células. Los ensayos clínicos realizados han demostrado que los pacientes con CPCNP avanzado y mutaciones de deleción en el exón 19 o mutaciones de sustitución L858R en el exón 21 tratados con IRESSA® como primera opción suelen experimentar beneficios clínicos en comparación con los pacientes a los que se les administra quimioterapia.^{11, 12, 13}

En la Tabla 3 se enumeran las mutaciones en EGFR detectadas por la prueba **cobas** EGFR.

Tabla 3 La prueba cobas EGFR se ha diseñado para detectar las mutaciones siguientes

| Exón | Grupo de mutaciones en EGFR | Secuencia de ácidos nucleicos de EGFR | Nomenclatura de proteínas de HGVS* | Nomenclatura de nucleótidos de HGVS* | ID de COSMIC ¹⁴ |
|-------------------------|---|---|---|---|----------------------------|
| Exón 18 | G719X | 2156G>C | LRG_304p1:p.(Gly719Ala) | LRG_304t1:c.2156G>C | 6239 |
| | | 2155G>A | LRG_304p1:p.(Gly719Ser) | LRG_304t1:c.2155G>A | 6252 |
| | | 2155G>T | LRG_304p1:p.(Gly719Cys) | LRG_304t1:c.2155G>T | 6253 |
| Exón 19 | Ex19Del | 2240_2251del12 | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer) | LRG_304t1:c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA | 6210 |
| | | 2239_2247del9 | LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del) | LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA | 6218 |
| | | 2238_2255del18 | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp) | LRG_304t1:c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC | 6220 |
| | | 2235_2249del15 | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del) | LRG_304t1:c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC | 6223 |
| | | 2236_2250del15 | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del) | LRG_304t1:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA | 6225 |
| | | 2239_2253del15 | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del) | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT | 6254 |
| | | 2239_2256del18 | LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del) | LRG_304t1:c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACA TCT | 6255 |
| | | 2237_2254del18 | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla) | LRG_304t1:c.2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT | 12367 |
| | | 2240_2254del15 | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del) | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT | 12369 |
| | | 2240_2257del18 | LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer) | LRG_304t1:c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC | 12370 |
| | | 2239_2248TTAAGAGAAG>C | LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro) | LRG_304t1:c.2239_2248delinsC | 12382 |
| | | 2239_2251>C | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro) | LRG_304t1:c.2239_2251delinsC | 12383 |
| | | 2237_2255>T | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal) | LRG_304t1:c.2237_2255delinsT | 12384 |
| | | 2235_2255>AAT | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle) | LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT | 12385 |
| | | 2237_2252>T | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal) | LRG_304t1:c.2237_2252delinsT | 12386 |
| | | 2239_2258>CA | LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln) | LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA | 12387 |
| | | 2239_2256>CAA | LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln) | LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA | 12403 |
| | | 2237_2253>TTGCT | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla) | LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT | 12416 |
| | | 2238_2252>GCA | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln) | LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA | 12419 |
| | | 2238_2248>GC | LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro) | LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC | 12422 |
| | | 2237_2251del15 | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla) | LRG_304t1:c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA | 12678 |
| | | 2236_2253del18 | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del) | LRG_304t1:c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA | 12728 |
| | | 2235_2248>AATTC | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro) | LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC | 13550 |
| | | 2235_2252>AAT | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle) | LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT | 13551 |
| | | 2235_2251>AATTC | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro) | LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC | 13552 |
| | | 2253_2276del24 | LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del) | LRG_304t1:c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAA CAAGGAAAT | 13556 |
| 2237_2257>TCT | LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer) | LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT | 18427 | | |
| 2238_2252del15 | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del) | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT | 23571 | | |
| 2233_2247del15 | LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del) | LRG_304t1:c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA | 26038 | | |
| Exón 20 | S768I | 2303G>T | LRG_304p1:p.(Ser768Ile) | LRG_304t1:c.2303G>T | 6241 |
| | T790M | 2369C>T | LRG_304p1:p.(Thr790Met) | LRG_304t1:c.2369C>T | 6240 |
| | Ex20Ins | 2307_2308ins9 GCCAGCGTG | LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup) | LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG | 12376 |
| | | 2319_2320insCAC | LRG_304p1:p.(His773dup) | LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC | 12377 |
| | | 2310_2311insGGT | LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly) | LRG_304t1:c.2310_2311insGGT | 12378 |
| | | 2311_2312ins9 GCGTGGACA | LRG_304p1:p.(Ser768_Asp770dup) | LRG_304t1:c.2303_2311dupGCGTGGACA | 13428 |
| 2309_2310AC>CCAGCGTGGAT | | LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup) | LRG_304t1:c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT | 13558 | |
| Exón 21 | L858R | 2573T>G | LRG_304p1:p.(Leu858Arg) | LRG_304t1:c.2573T>G | 6224 |
| | L861Q | 2573_2574TG>GT | LRG_304p1:p.(Leu858Arg) | LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT | 12429 |
| | | 2582T>A | LRG_304p1:p.(Leu861Gln) | LRG_304t1:c.2582T>A | 6213 |

* HGVS – Human Genome Variation Society

Principios del procedimiento

La prueba **cobas** EGFR se basa en dos procesos principales: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN a partir de FFPET o plasma; y (2) amplificación y detección del ADN diana mediante PCR y pares de cebadores (primers) complementarios y sondas oligonucleótidas con marcadores fluorescentes. La prueba **cobas** EGFR se ha diseñado para detectar las mutaciones siguientes:

- Exón 18: G719X (G719A, G719C y G719S)
- Exón 19: deleciones y mutaciones complejas (definidas como la combinación de una deleción con una inserción)
- Exón 20: S768I, T790M e inserciones
- Exón 21: L858R y L861Q

La detección de la mutación se realiza mediante el análisis de PCR con el **cobas z 480 analyzer**. Cada serie incluye un control de mutación y un control negativo para confirmar la validez de la serie.

Preparación de las muestras

El **cobas**® DNA Sample Preparation Kit y el **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit están diseñados para preparaciones manuales de muestras de FFPET y plasma, respectivamente, basadas en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. La proteasa y un buffer de lisis/unión caotrópico liberan los ácidos nucleicos y protegen el ADN liberado de las DNasas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos celulares, se eliminan mediante centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN de la diana en el **cobas z 480 analyzer** mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba **cobas** EGFR.

Amplificación mediante PCR

Selección de la diana

La prueba **cobas** EGFR utiliza cebadores que definen secuencias específicas de pares de bases para cada una de las mutaciones diana de la prueba. Para las mutaciones por deleción en el exón 19, se analizan las secuencias de entre 125 y 141 pares de bases; para la mutación de sustitución L858R en el exón 21, se analiza una secuencia de 138 pares de bases; para la mutación por sustitución T790M en el exón 20, se analiza una secuencia de 118 pares de bases; para la mutación por sustitución G719X en el exón 18, se analizan secuencias de entre 104 y 106 pares de bases; para la mutación de sustitución S768I en el exón 20, se analiza una secuencia de 133 pares de bases; para las mutaciones de inserción en el exón 20, se analizan secuencias de entre 125 y 143 pares de bases; para la mutación de sustitución L861Q en el exón 21, se analiza una secuencia de 129 pares de bases. La amplificación tiene lugar únicamente en las regiones del gen EGFR comprendidas entre los cebadores. No se amplifica el gen EGFR entero.

Amplificación de la diana

Para la amplificación de la diana se utiliza un derivado de la ADN polimerasa Z05-AS1 de la especie *Thermus*. En primer lugar, se calienta la mezcla de la PCR para desnaturalizar el ADN y exponer las secuencias de la diana del cebador. A medida que se enfría la mezcla, los cebadores que van en un sentido y en sentido contrario se hibridan con las secuencias del ADN diana. La ADN polimerasa Z05, en presencia de cationes metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores hibridados, lo que provoca la síntesis con una segunda cadena de ADN. Con esto se completa el primer ciclo de la PCR, que da lugar a una copia de ADN bicatenario que incluye las regiones de pares de bases de la diana del gen EGFR. Este proceso se repite un número determinado de ciclos, en cada uno de los cuales se duplica el volumen de ADN del amplicón.

DetECCIÓN DE LA MUTACIÓN EN TIEMPO REAL AUTOMATIZADA

La prueba **cobas** EGFR utiliza la tecnología de la PCR a tiempo real. Cada sonda oligonucleotídica específica para una diana de la reacción se marca con un marcador fluorescente que actúa como emisor (reporter) y una molécula silenciadora (quencher) que absorbe las emisiones de fluorescencia del marcador emisor de una sonda intacta. Durante cada ciclo de amplificación, la sonda complementaria se une a la secuencia de ADN monocatenaria del amplicón y, posteriormente, se escinde por la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05-AS1. Una vez que el marcador emisor se separa del silenciador por la actividad de la nucleasa, es posible medir la fluorescencia con una longitud de onda característica cuando el marcador emisor se excita con el espectro lumínico adecuado. Se utilizan cuatro marcadores emisores distintos para etiquetar las mutaciones que pretende detectar la prueba. La amplificación de las siete secuencias diana del EGFR se detecta de manera independiente mediante tres reacciones que miden la fluorescencia en las cuatro longitudes de onda características de los canales ópticos dedicados.

AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

La amplificación selectiva de la diana de ácido nucleico de la muestra se logra en la prueba **cobas** EGFR mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP).¹⁵ La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no del ADN que contiene timidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de dUTP en lugar de trifosfato de desoxitimidina como uno de los trifosfatos del nucleótido en los reactivos de la Master Mix, por lo que solo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de realizar la amplificación del ADN de la diana. La enzima AmpErase, que se incluye en el reactivo de la Master Mix, cataliza la escisión del ADN que contiene desoxiuridina en la posición de los residuos de desoxiuridina abriendo la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta durante el primer paso del ciclo térmico hasta un nivel pH alcalino, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón diana. La prueba **cobas** EGFR es capaz de inactivar la deoxiuridina que contiene amplicón mutado del EGFR.

SIGA LAS INSTRUCCIONES DEL APARTADO A PARA EL USO CON MUESTRAS DE TEJIDO.

SIGA LAS INSTRUCCIONES DEL APARTADO B PARA EL USO CON MUESTRAS DE PLASMA.

APARTADO A: PARA USO CON MUESTRAS DE TEJIDO

Consulte el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) para el aislamiento de ADN en muestras de tejido.

Materiales y reactivos

Materiales y reactivos suministrados

| Kit/Casetes | Componentes e ingredientes de los reactivos | Cantidad por prueba | Símbolo de seguridad y advertencia |
|---|---|---------------------|------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2 24 pruebas (M/N: 07248563190) | EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N 06471366001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |
| | EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N 06471382001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |

| Kit/Casetes | Componentes e ingredientes de los reactivos | Cantidad por prueba | Símbolo de seguridad y advertencia |
|---|--|---------------------|------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2 24 pruebas (M/N: 07248563190) | EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N 07248610001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |
| | MGAC (Acetato de magnesio) (M/N 05854326001) Acetato de magnesio 0,09 % de azida sódica | 6 × 0,2 ml | N/A |
| | EGFR MC (Control de mutación en EGFR) (M/N 06471455001) Buffer Tris EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,1 % de ADN plasmídico que contiene secuencias del exón 18, 19, 20 y 21 del EGFR (microbianas) < 0,1 % de ADN EGFR no mutado (cultivo celular) | 6 × 0,1 ml | N/A |
| | DNA SD (Diluyente para muestras de ADN) (M/N 05854474001) Buffer Tris-HCl 0,09 % de azida sódica | 2 × 3,5 ml | N/A |

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

| Reactivo | Temperatura de almacenamiento | Periodo de almacenamiento |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| cobas® EGFR Mutation Test v2* | Entre 2 °C y 8 °C | Una vez abierto, se mantiene estable para 4 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero. |

* Los reactivos **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** y la solución MMX de trabajo (preparada añadiendo **MGAC** a **EGFR MMX-1** o **EGFR MMX-2** o **EGFR MMX-3 v2**) deben protegerse de la exposición a la luz. La mezcla MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la mezcla MMX de trabajo.

Material adicional necesario

| Materiales | M/N |
|--|---------------------|
| cobas® DNA Sample Preparation Kit | Roche 05985536190 |
| Lejía | Cualquier proveedor |
| Etanol al 70 % | Cualquier proveedor |
| Microplaca (placa de amplificación y detección) y película de sellado para el cobas® 4800 System | Roche 05232724001 |
| Aplicador de película de sellado para el cobas® 4800 System (suministrado con la instalación del cobas® 4800 System) | Roche 04900383001 |
| Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl) | Cualquier proveedor |
| Puntas exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo | Cualquier proveedor |
| Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR) | Cualquier proveedor |
| Bandejas de tubos para microcentrífuga | Cualquier proveedor |
| Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN* | Cualquier proveedor |
| Agitador vórtex* | Cualquier proveedor |
| Guantes desechables sin talco | Cualquier proveedor |
| Congelador que permita el almacenamiento de -25 °C a -15 °C | Cualquier proveedor |

* Debe realizarse el mantenimiento del equipo de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Equipos y programas necesarios pero no suministrados

| Equipos y programas necesarios, no suministrados |
|---|
| cobas z 480 Analyzer |
| Unidad de control del cobas® 4800 System con versión 2.1 o posterior del programa |
| Software del paquete de análisis de tejidos EGFR P1 versión 1.0 o posterior |
| Lector de códigos de barras ext. por USB |
| Impresora |

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.

- Esta prueba debe utilizarse con muestras de FFPET de CPCNP. Las muestras deben tratarse como material infeccioso y, como tal, deben aplicarse los procedimientos de seguridad de laboratorio descritos en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ y en el documento M29-A4 del CLSI.¹⁷
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipeteador exentas de DNasa.

Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.

Nota: la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para la prueba cobas EGFR, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección. Para evitar la contaminación de la solución Master Mix de trabajo con muestras de ADN, el área de trabajo de amplificación y detección debería limpiarse exhaustivamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo.

Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.

- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Eliminación de residuos

- Los reactivos **MGAC**, **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2**, **EGFR MC** y **DNA SD** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

Limpieza de derrames

- Si el derrame se produce sobre el **cobas® 4800 instrument**, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en el Manual de usuario correspondiente del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el **cobas z 480 analyzer**. Limpie el **cobas z 480 analyzer** según las instrucciones detalladas en el Manual de usuario correspondiente del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del **cobas z 480 analyzer**, consulte el Manual de usuario del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Recogida de muestras

Las muestras de FFPET de CPCNP se han validado para su uso con la prueba **cobas EGFR**.

Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

Las muestras de FFPET de CPCNP se pueden transportar a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. El transporte de las muestras de FFPET debe cumplir las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales para el transporte de agentes etiológicos.¹⁸

Se ha comprobado la estabilidad de las muestras de FFPET por un periodo de hasta 12 meses después de la fecha de obtención siempre y cuando se almacenen a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. Pueden conservarse secciones de 5 µm colocadas en portaobjetos a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante un máximo de 60 días.

Estabilidad de las muestras de FFPET:

| Tipo de muestra de FFPET | Bloque de FFPET | Sección de FFPET de 5 µm |
|--|---------------------|--------------------------|
| Temperatura de almacenamiento para muestras de FFPET | Entre 15 °C y 30 °C | Entre 15 °C y 30 °C |
| Periodo de almacenamiento | Hasta 12 meses | Hasta 60 días |

Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

Estabilidad de las muestras procesadas (ADN extraído):

| Temperatura de almacenamiento del ADN extraído | Entre -15 °C y -25 °C | Entre 2 °C y 8 °C | Entre 15 °C y 30 °C |
|---|--|--------------------------|----------------------------|
| Periodo de almacenamiento | Hasta 3 ciclos de congelación/ descongelación durante 60 días | Hasta 14 días | Hasta 1 día |

El ADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

Procedimiento analítico

Realización de la prueba

Ilustración 1 Flujo de trabajo de la prueba cobas EGFR con el cobas® DNA Sample Preparation Kit

| | |
|----|--|
| 1 | Inicie el sistema. |
| 2 | Efectúe el mantenimiento del equipo. |
| 3 | Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento. |
| 4 | Desparafinice las muestras. |
| 5 | Lleve a cabo el aislamiento del ADN. |
| 6 | Eluya el ADN. |
| 7 | Cree la petición de trabajo e imprima la distribución de la placa. |
| 8 | Prepare los reactivos de amplificación. |
| 9 | Cargue la placa de amplificación y detección con los reactivos de amplificación. |
| 10 | Cargue la placa de amplificación y detección con muestras. |
| 11 | Selle la placa de amplificación y detección. |
| 12 | Cargue la placa de amplificación y detección en el cobas z 480 analyzer . |
| 13 | Inicie la serie analítica. |
| 14 | Revise los resultados. |
| 15 | Con LIS: envíe los resultados al LIS. |
| 16 | Descargue el analizador. |

Instrucciones de uso

Nota: la prueba **cobas EGFR** solamente admite secciones de FFPET de CPCNP con un grosor de 5 µm y que contengan como mínimo un 10 % de células tumorales. Las muestras con menos de un 10 % de células tumorales por área deben someterse a macrodissección después de la desparafinación.

Nota: consulte el Manual de usuario del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800** para obtener instrucciones de funcionamiento detalladas del **cobas z 480 analyzer**.

Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada microplaca de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba **cobas EGFR**.

La prueba **cobas EGFR** contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

Control para todo el proceso

Esta prueba requiere un control negativo para todo el proceso. En cada serie debe procesarse un control negativo junto con las muestras empezando por el procedimiento de **aislamiento de ADN**.

Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras FFPET mediante el **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190).

Macrodissección

Si la muestra contiene menos de un 10 % de células tumorales por área, será necesario proceder a su macrodissección como parte de la preparación de la muestra.

Cuantificación del ADN

Nota: la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.

Nota: almacene el stock de ADN según las instrucciones del apartado **Almacenamiento y estabilidad de las muestras durante el transporte**.

1. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
2. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice **DNA EB** del **cobas®** DNA Sample Preparation Kit como blanco para el instrumento. Es necesario un promedio de dos lecturas coincidentes. Si las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/ μ l, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN $< 20,0$ ng/ μ l, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los ± 2 ng/ μ l. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a ± 10 % entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son $\geq 20,0$ ng/ μ l o mayor a ± 2 ng/ μ l cuando las lecturas de concentración de ADN son $< 20,0$ ng/ μ l, se deben realizar 2 lecturas adicionales hasta que se cumplan los requisitos. A continuación, debe calcularse el promedio de estas dos nuevas mediciones.

Nota: no es necesario medir el stock de ADN del control negativo (**NEG**) procesado.

3. La concentración del stock de ADN de las muestras debe ser ≥ 2 ng/ μ l para realizar la prueba **cobas** EGFR. Se realizan tres ciclos de amplificación/detección por muestra, para cada uno de los cuales se utilizan 25 μ l de una dilución de 2 ng/ μ l de stock de ADN (un total de 50 ng de ADN).

Nota: cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 2 ng/ μ l para realizar la prueba **cobas** EGFR. Si la concentración de un stock de ADN es < 2 ng/ μ l, repita los procedimientos de desparafinación, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN para la muestra en cuestión utilizando dos secciones de FFPET de 5 μ m. En los casos de las muestras colocadas en portaobjetos, tras la desparafinación, combine el tejido de ambas secciones en un tubo, sumerja el tejido en **TLB + PK** del **cobas** DNA Sample Preparation Kit y lleve a cabo el aislamiento y la cuantificación de ADN. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine el tejido de ambas secciones en un tubo y lleve a cabo los procesos de desparafinación, aislamiento y cuantificación de ADN. Si la concentración del stock de ADN sigue siendo < 2 ng/ μ l, solicite otra sección de muestra de FFPET al centro clínico correspondiente.

Amplificación y detección

Nota: para evitar la contaminación de las mezclas MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Configuración del equipo

Consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones de configuración detalladas del cobas z 480.

Configuración de las peticiones de pruebas

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR, consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. En una serie con solo muestras de tejido, el control de mutación se carga en las posiciones **A01-A03** de la placa. El control negativo se carga en las posiciones **B01-B03** de la placa. A continuación se añaden las muestras diluidas en conjuntos de 3 columnas, comenzando por **C01-C03** hasta **H10-H12**, tal como se muestra en la Ilustración 2.

La prueba cobas EGFR puede ejecutarse en el modo de análisis combinado (p. ej., tejido de EGFR con plasma de EGFR). Las posiciones de los controles pueden variar dependiendo de las pruebas seleccionadas y los números de muestras. Consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener más información sobre la configuración de una serie de análisis combinado.

Ilustración 2 Distribución de la placa para la prueba cobas EGFR

| Fila/Columna | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|
| A | MC MMX 1 | MC MMX 2 | MC MMX 3 v2 | S7 MMX 1 | S7 MMX 2 | S7 MMX 3 v2 | S15 MMX 1 | S15 MMX 2 | S15 MMX 3 v2 | S23 MMX 1 | S23 MMX 2 | S23 MMX 3 v2 |
| B | NEG MMX 1 | NEG MMX 2 | NEG MMX 3 v2 | S8 MMX 1 | S8 MMX 2 | S8 MMX 3 v2 | S16 MMX 1 | S16 MMX 2 | S16 MMX 3 v2 | S24 MMX 1 | S24 MMX 2 | S24 MMX 3 v2 |
| C | S1 MMX 1 | S1 MMX 2 | S1 MMX 3 v2 | S9 MMX 1 | S9 MMX 2 | S9 MMX 3 v2 | S17 MMX 1 | S17 MMX 2 | S17 MMX 3 v2 | S25 MMX 1 | S25 MMX 2 | S25 MMX 3 v2 |
| D | S2 MMX 1 | S2 MMX 2 | S2 MMX 3 v2 | S10 MMX 1 | S10 MMX 2 | S10 MMX 3 v2 | S18 MMX 1 | S18 MMX 2 | S18 MMX 3 v2 | S26 MMX 1 | S26 MMX 2 | S26 MMX 3 v2 |
| E | S3 MMX 1 | S3 MMX 2 | S3 MMX 3 v2 | S11 MMX 1 | S11 MMX 2 | S11 MMX 3 v2 | S19 MMX 1 | S19 MMX 2 | S19 MMX 3 v2 | S27 MMX 1 | S27 MMX 2 | S27 MMX 3 v2 |
| F | S4 MMX 1 | S4 MMX 2 | S4 MMX 3 v2 | S12 MMX 1 | S12 MMX 2 | S12 MMX 3 v2 | S20 MMX 1 | S20 MMX 2 | S20 MMX 3 v2 | S28 MMX 1 | S28 MMX 2 | S28 MMX 3 v2 |
| G | S5 MMX 1 | S5 MMX 2 | S5 MMX 3 v2 | S13 MMX 1 | S13 MMX 2 | S13 MMX 3 v2 | S21 MMX 1 | S21 MMX 2 | S21 MMX 3 v2 | S29 MMX 1 | S29 MMX 2 | S29 MMX 3 v2 |
| H | S6 MMX 1 | S6 MMX 2 | S6 MMX 3 v2 | S14 MMX 1 | S14 MMX 2 | S14 MMX 3 v2 | S22 MMX 1 | S22 MMX 2 | S22 MMX 3 v2 | S30 MMX 1 | S30 MMX 2 | S30 MMX 3 v2 |

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra y MMX n.º = reactivo de Master Mix 1, 2 o 3 v2.

Nota: cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

Nota: la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo v2 se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

Nota: se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.

Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN entre 2 ng/μl y 36 ng/μl

Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

- Para cada muestra, se debe calcular el volumen (μl) de stock de ADN necesario:

$$\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentración de stock de ADN [ng}/\mu\text{l}]$$
- Para cada muestra, se debe calcular el volumen (μl) de **DNA SD** necesario:

$$\mu\text{l de DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l de stock de ADN}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 6,5 ng/μl

- $\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$
- $\mu\text{l de DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$

Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl

Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.

Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).

- Con concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de **DNA SD** necesario para preparar al menos 90 μl de stock de ADN diluido. De esta manera se garantiza que cada muestra utilice como mínimo 5 μl de stock de ADN.
- Para cada muestra, calcule el volumen de (μl) de **DNA SD** necesario para diluir 5 μl de stock de ADN en 2 ng/μl:

$$\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l de stock de ADN} \times \text{concentración de stock de ADN en ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 100 ng/μl

- $\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
- Utilice el volumen calculado de **DNA SD** para diluir 5 μl de stock de ADN.

Dilución de muestras

- Prepare el número adecuado de tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml para diluciones de ADN etiquetándolos con la identificación de muestra correspondiente.
- Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, pipetee los volúmenes calculados de **DNA SD** en los tubos etiquetados correspondientes. Pipetee 45 μl de **DNA SD** en un tubo para microcentrífuga con tapa de bloqueo etiquetado como **NEG**.
- Mezcle cada stock de ADN y el control negativo mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
- Con un pipeteador con punta de pipeta resistente a aerosoles (una punta nueva para cada pipeteado), pipetee con cuidado el volumen calculado de cada stock de ADN en el tubo etiquetado correspondiente que contiene **DNA SD**. Pipetee 45 μl de control negativo (elución extraída) en el tubo **NEG**.
- Tape los tubos y agítelos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
- Cámbiese los guantes.

Configuración de las reacciones

Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)

Nota: las mezclas **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** y **MMX** de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición a la luz.

Nota: debido a la viscosidad de los reactivos **EGFR MMX** y la mezcla **MMX** de trabajo, es importante pipetear con lentitud para asegurar que toda la muestra se dispensa por completo a través de la punta.

Nota: las mezclas **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** y **EGFR MMX-3 v2** pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.

Prepare tres mezclas MMX de trabajo a granel: una con **EGFR MMX-1**, otra con **EGFR MMX-2** y la tercera con **EGFR MMX-3 v2** en tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** o **EGFR MMX-3 v2** necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Calcule el volumen de **MGAC** necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 4 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

Tabla 4 Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones **MMX-1**, **MMX-2** y **MMX-3 v2** de trabajo

| | | N.º muestras* | | | | | | | | | |
|--|-------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| MMX | 20 µl | 80 | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 240 | 260 |
| MGAC | 5 µl | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 |
| Vol. total para cada MMX de trabajo (µl) | | 100 | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250 | 275 | 300 | 325 |

* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales de **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** y **MGAC** necesario de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrífuga estéril para la mezcla **MMX-1** de trabajo, **MMX-2** de trabajo y **MMX-3 v2** de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** o **EGFR MMX-3 v2** al tubo de **MMX** de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de **MGAC** a los tubos de **MMX** de trabajo.
6. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

Nota: las muestras y los controles deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas **MMX** de trabajo.

Nota: utilice únicamente placas de amplificación y detección y películas de sellado para el **cobas® 4800 System**.

Preparación de la placa

1. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección necesario para el análisis. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
 - Añada MMX-1 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-1**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
 - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
 - Añada MMX-3 v2 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-3 v2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.
2. Pipetee 25 µl de **EGFR MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

Nota: cada serie debe contener **EGFR MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03**, y un control negativo **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03**. En caso contrario, el **cobas z 480 analyzer** invalidará la serie.

Nota: cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra diluida, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos **C01**, **C02** y **C03** de la placa de amplificación y detección con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN de cada muestra y siga la plantilla de la Ilustración 2 hasta que todas las diluciones de muestras de ADN estén cargadas en la placa de amplificación y detección. Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.
5. Tape la placa de amplificación y detección con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la placa de amplificación y detección.
6. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

Nota: los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla MMX de trabajo.

Inicio de la PCR

Consulte el Manual de usuario del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo para EGFR. Cuando aparezca la ventana emergente “Select test”, seleccione “EGFR Tissue P1” y haga clic en el botón “OK”.

Resultados

Interpretación de los resultados

Nota: la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el cobas® 4800 software.

Nota: una prueba válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5 Interpretación de los resultados de la prueba cobas EGFR

| Resultado de la prueba | Resultado de la mutación | Interpretación |
|-----------------------------|--|---|
| Mutation Detected | Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Puede existir más de una mutación) | Se ha detectado una mutación en la región del EGFR diana de la prueba especificada. |
| No Mutation Detected (NMD)* | N/A | No se ha detectado ninguna mutación en las regiones del EGFR analizadas. |
| No válido | N/A | El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos que figura más adelante. |
| Erróneo | N/A | Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica. |

* Un resultado “No Mutation Detected” no excluye la presencia de una mutación en las regiones del EGFR analizadas porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

Los avisos de resultados se muestran en la pestaña de resultados (pantalla) o en la columna de avisos (informe). Consulte el apartado **Avisos de resultados** para obtener información detallada.

Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos

1. Repita la dilución del stock de ADN de la muestra no válida empezando por los procedimientos “Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra” y “Dilución de muestras” del apartado **Amplificación y detección**.
2. Después de realizar la dilución del stock de ADN a 2 ng/µl según las instrucciones del apartado “Dilución de muestras”, continúe con los pasos descritos en el apartado “Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)” y con el resto de los pasos del procedimiento de amplificación y detección.

Nota: si la muestra sigue siendo no válida después del nuevo análisis o si no hay suficiente stock de ADN para preparar otra dilución según el paso 1 del apartado **Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos**, repita todo el procedimiento de análisis de la muestra, empezando por el proceso de desparafinación y aislamiento de ADN utilizando una nueva sección tumoral de FFPET de 5 µm.

Control de calidad y validez de los resultados

Para cada serie con un máximo de 30 muestras incluye un juego de control de mutación en EGFR de **cobas (EGFR MC)** (pocillos **A01**, **A02** y **A03**) y un control negativo (**NEG**) (pocillos **B01**, **B02** y **B03**) para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo. Una serie se considera válida cuando los controles **EGFR MC** y **NEG** son válidos. Si **EGFR MC** o **NEG** no son válidos, toda la serie se considera no válida y debe repetirse. Prepare una dilución nueva del stock de ADN de la muestra aislada previamente para configurar una nueva placa de amplificación y detección con controles para la amplificación y detección.

Control de mutación

El resultado del control **EGFR MC** debe ser "Valid". Si los resultados de **EGFR MC** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control negativo

El resultado del control **NEG** debe ser "Valid". Si los resultados de **NEG** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Limitaciones del procedimiento

1. Analice solo los tipos de muestras indicados. La prueba **cobas** EGFR se ha validado únicamente para su uso con muestras tumorales de FFPET de CPCNP.
2. La prueba **cobas** EGFR se ha validado únicamente con el **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que la fijación, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras sean adecuados. Siga los procedimientos de las Instrucciones de uso del **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), en estas Instrucciones de uso y en el Manual de usuario del **cobas®** 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas®** 4800 System.
5. Tampoco se han evaluado los efectos de otras variables potenciales como la fijación de muestras.
6. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba **cobas** EGFR permite realizar una amplificación selectiva del ADN diana; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos.
7. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del **cobas®** 4800 System.
8. Solamente **cobas z** 480 analyzer se ha validado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
9. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas.
10. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.
11. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen EGFR cubiertas por los cebadores o las sondas de la prueba **cobas** EGFR pueden causar errores en la detección de la presencia de una mutación en los exones 18, 19, 20 y 21 (resultados "No Mutation Detected").

12. La prueba **cobas** EGFR presenta reactividad cruzada (resultados “Mutation Detected”) con la mutación L747S del exón 19, una mutación adquirida poco frecuente que puede presentar resistencia al tratamiento con TKI.¹⁹
13. La prueba **cobas** EGFR se ha validado para el uso con 50 ng de ADN por pocillo de reacción. No se recomienda introducir cantidades de ADN inferiores a 50 ng por pocillo de reacción.
14. La prueba **cobas** EGFR es una prueba cualitativa. La prueba no debe utilizarse para realizar mediciones cuantitativas del porcentaje de mutación.
15. Las muestras de FFPET de CPCNP que contienen ADN degradado pueden afectar la capacidad de la prueba para detectar mutaciones en el gen EGFR.
16. Es posible que las muestras con resultados “No Mutation Detected” contengan mutaciones en EGFR que el ensayo no detecta.
17. La prueba **cobas** EGFR detecta mutaciones en EGFR en pacientes con CPCNP cuyos tumores presentan sustituciones en el exón 18 (G719X), deleciones en el exón 19, inserciones y sustituciones en el exón 20 (T790M, S768I) y sustituciones en el exón 21 (L858R, L861Q), pero ningún otro tipo de mutación en EGFR.

Evaluación no clínica del rendimiento

Nota: las descripciones del estudio que se muestran a continuación incluyen datos acumulados obtenidos con la v1 y la v2 de la prueba **cobas** EGFR.

En los estudios no clínicos que se describen a continuación, el porcentaje tumoral se evaluó mediante revisión patológica. Se utilizaron la secuenciación bidireccional Sanger y la secuenciación de próxima generación (NGS) para seleccionar las muestras de análisis. El porcentaje de mutación de las muestras de FFPET de CPCNP se determinó a partir de un método NGS.

Sensibilidad analítica – Límite de blanco

Para evaluar el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR en ausencia de una plantilla y asegurarse de que una muestra en blanco no generase una señal analítica que pudiera indicar una concentración de mutación baja, se evaluaron muestras sin plantilla y muestras de EGFR no mutado de FFPET de CPCNP. De acuerdo con el análisis descrito en la directriz EP17-A2 del CLSI²⁰, se determinó que el límite de blanco fuese cero para todas las mutaciones.

Límite de detección con mezclas de muestras de FFPET

Se mezclaron tres extractos de ADN de muestras de FFPET para las mutaciones por deleción en el exón 19, cuatro extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación L858R, dos extractos de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para las mutaciones L858R y T790M, dos extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación G719A, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para T790M y G719A, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para las mutaciones G719C y S768I, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para S768I y G719S, tres extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación por inserción en el exón 20 y tres extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación L861Q con extractos de muestras de FFPET de EGFR no mutado para conseguir muestras con un nivel de mutación deseada del 10, 5,0, 2,5 y 1,25 %, tal y como determina un método de secuenciación de próxima generación (NGS), validado para el uso en la detección de mutaciones en EGFR en los exones 18, 19, 20 y 21. Se prepararon diluciones en serie de cada mezcla de muestras y se analizaron ocho réplicas de cada miembro del panel utilizando cada uno de los tres lotes del kit de la prueba **cobas** EGFR (n = 24/miembro del panel). El límite de detección de cada muestra se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó un resultado “Mutation Detected” para EGFR de como mínimo un 95 % para la mutación analizada, tal y como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6 Límite de detección de la prueba cobas EGFR con mezclas de muestras de FFPET

| Exón del EGFR | Grupo de mutaciones en EGFR | Secuencia de ácidos nucleicos de EGFR | Porcentaje de mutación del miembro del panel necesario para obtener una tasa de resultados "Mutation Detected" ≥ 95 % con un volumen inicial de ADN de 50 ng por pocillo de reacción (N = 24 réplicas) | ID de COSMIC ¹⁴ |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------|
| 18 | G719X | 2156 G>C | 2,5 | 6239 |
| | | 2156 G>C | 4,7 | 6239 |
| | | 2155 G>A | 3,2 | 6252 |
| | | 2155 G>T | 5,6 | 6253 |
| 19 | Delección en el exón 19 | 2235_2249del15 | 1,4 | 6223 |
| | | 2236_2250del15 | 2,5 | 6225 |
| | | 2239_2256del18* | 4,7 | 6255 |
| | | 2240_2254del15 | 7,2 | 12369 |
| | | 2240_2257del18 | 13,4** | 12370 |
| | | 2239_2248>C | 2,2 | 12382 |
| | | 2237_2255>T* | 4,1 | 12384 |
| | | 2237_2253>TTGCT* | 6,3 | 12416 |
| | | 2238_2252del15 | 2,4 | 23571 |
| | | 2238_2252del15* | 5,5 | 23571 |
| | 2239_2257>GT* | 6,0 | No identificado | |
| 20 | T790M | 2369 C>T | 2,0 | 6240 |
| | | 2369 C>T | 2,4 | 6240 |
| | | 2369 C>T | 3,0 | 6240 |
| | S768I | 2303 G>T | 1,3 | 6241 |
| | | 2303 G>T | 2,4 | 6241 |
| | Inserción en el exón 20 | 2307_2308insGCCAGCGTG | 1,7 | 12376 |
| | | 2319_2320insCAC | 6,8 | 12377 |
| | 2310_2311insGGT | 1,3 | 12378 | |
| 21 | L858RP | 2573 T>G | 4,0 | 6224 |
| | | 2573 T>G | 4,2 | 6224 |
| | | 2573 T>G | 4,3 | 6224 |
| | | 2573 T>G | 4,3 | 6224 |
| | | 2573 T>G | 5,3 | 6224 |
| | L861Q | 2582T>A | 2,1 | 6213 |
| | | 2582T>A | 2,2 | 6213 |
| | | 2582T>A | 3,4 | 6213 |

* Para las mutaciones no dominantes de delección del exón 19 presentes en la cohorte EURTAC solamente se analizó un nivel diana de aproximadamente un 5 % de mutación. Las mezclas de ADN de muestras se analizaron en 3 laboratorios.

** El límite de detección de la prueba **cobas** EGFR para esta mutación supera el nivel de mutación del 10 % si se utiliza el volumen estándar de 50 ng por pocillo de reacción.

Este estudio demuestra que la prueba **cobas** EGFR es capaz de detectar mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR con un nivel de mutación mínimo del 5 % cuando se utiliza un volumen inicial estándar de 50 ng por pocillo de reacción.

Contenido tumoral mínimo

Se analizaron un total de 66 muestras distintas con mutación en EGFR (es decir, 35 con mutaciones de delección del exón 19 y 31 con mutaciones L858R del exón 21) cuyo contenido tumoral oscilaba entre el 25 % y el 99 % para determinar el contenido tumoral mínimo necesario para la detección de mutaciones en EGFR en muestras de CPCNP. Ninguna de las muestras evaluadas presentaba la combinación de mutaciones de delección del exón 19 y mutación L858R del exón 21. Todas las muestras se analizaron sin macrodissección (sin diluir) y con posterioridad a la macrodissección. Los valores de CtR observados para los portaobjetos sin diluir y macrodisseccionados se analizaron mediante regresión de Deming y el gráfico de Bland-Altman (diferencia vs. media). Los resultados refuerzan el uso de muestras con un contenido tumoral superior al 25 % sin macrodissección.

Se analizaron 10 muestras adicionales de EGFR no mutado de CPCNP (contenido tumoral del 1-90 %) y 10 muestras mutantes de EGFR (contenido tumoral del 8-95 %) para determinar si la macrodissección de tejido tumoral de CPCNP con un porcentaje tumoral bajo mejoraba la capacidad de detección de la prueba cobas EGFR. Todas las muestras se analizaron sin macrodissección (sin diluir) y con posterioridad a la macrodissección. Todos los resultados de las muestras macrodisseccionadas coincidieron con los resultados de las muestras sin macrodisseccionar y las 20 muestras presentaron los resultados mutados y no mutados esperados.

En el estudio EURTAC fase III de tratamiento con erlotinib vs. quimioterapia basada en cisplatino, las muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10 % se macrodisseccionaron antes de realizar el análisis de la mutación en EGFR. Se analizó un subconjunto de las muestras cribadas de EURTAC mediante la prueba cobas EGFR y el método de secuenciación de próxima generación (NGS) para determinar el estado mutacional del gen EGFR. En la Tabla 7 y la Tabla 8 se incluyen las muestras de CPCNP con resultados válidos para la mutación combinada del exón 19 o L858R en el gen EGFR tanto con la prueba cobas EGFR como con el método de secuenciación NGS. Cuando se utiliza la NGS como método de referencia, los resultados prueban que la macrodissección de secciones de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10 % ofrece una precisión analítica comparable a la sección de FFPET de CPCNP sin macrodissección.

Ambos estudios avalan la necesidad de realizar una macrodissección de las secciones de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10 % antes de realizar la prueba cobas EGFR.

Tabla 7 Rendimiento de la prueba cobas EGFR para muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral ≤ 10 % (macrodisseccionadas)

| Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|---|--------------------------------|----------------|
| Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 97,2 % (35/36) | 85,8 %, 99,5 % |
| Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 94,5 % (52/55) | 85,1 %, 98,1 % |
| Porcentaje de concordancia global (PCG) | 95,6 % (87/91) | 89,2 %, 98,3 % |

Tabla 8 Rendimiento de la prueba cobas EGFR para muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral > 10 % (sin macrodisseccionar)

| Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|---|--------------------------------|----------------|
| Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 93,0 % (107/115) | 86,9 %, 96,4 % |
| Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 98,5 % (199/202) | 95,7 %, 99,5 % |
| Porcentaje de concordancia global (PCG) | 96,5 % (306/317) | 93,9 %, 98,1 % |

Reactividad cruzada con otras mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21

Muestras del ensayo clínico EURTAC

La prueba cobas EGFR generó el resultado “Mutation Detected” para las siguientes mutaciones del gen EGFR detectadas en las muestras del ensayo clínico EURTAC (Tabla 9). No obstante, no se ha evaluado el rendimiento analítico de la prueba cobas EGFR para la detección de dichas mutaciones.

Tabla 9 Mutaciones detectadas en la cohorte EURTAC que presentan reactividad cruzada con la prueba cobas EGFR

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|------|-----------------------|-------------|----------------------------|
| 19 | 2236_2252>AT | E746_T751>I | 26680 |
| | 2239_2253>CAA | L747_T751>Q | 51527 |
| | 2234_2251>AAT | K745_T751>K | No identificado |
| | 2236_2244del9 | E746_R748>E | No identificado |
| | 2236_2263>GAAGCAT | E746_A755>E | No identificado |
| | 2237_2251>AAC | E746_751T>E | No identificado |

Muestras del ensayo clínico AURA2

La prueba cobas EGFR generó el resultado “Mutation Detected” para la siguiente mutación del gen EGFR detectadas en las muestras del ensayo clínico AURA2 (Tabla 10). No obstante, no se ha evaluado el rendimiento analítico de la prueba cobas EGFR para la detección de esta mutación.

Tabla 10 Mutaciones detectadas en el estudio AURA2 que presentan reactividad cruzada con la prueba cobas EGFR

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|------|-----------------------|-----------|----------------------------|
| 21 | 2572_2573CT>AG | L858R | 13553 |

Especificidad – Microorganismos y homólogos de EGFR

La especificidad de la prueba cobas EGFR se evaluó mediante el análisis de microorganismos pulmonares y plásmidos de homólogos de EGFR, es decir, plásmidos cuyas secuencias de las regiones genéticas HER2, HER3 y HER4 eran análogas a las secuencias de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR amplificadas mediante la prueba cobas EGFR.

Microorganismos pulmonares

Se ha observado que las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* con una concentración de 4×10^5 unidades formadoras de colonias no presentan reactividad cruzada ni interfieren en la detección de la prueba cobas EGFR cuando se añaden a muestras que contienen secuencias de EGFR mutado y no mutado durante el proceso de lisis del tejido.

Plásmidos de homólogos de EGFR

Se ha demostrado que las secuencias análogas relacionadas estructuralmente con el receptor proteína tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) no presentan reactividad cruzada con la prueba cobas EGFR cuando la secuencia que podría presentar reactividad cruzada se añade al stock de ADN aislado antes del procedimiento de amplificación/detección en un número de copias genómicas equivalente a un nivel de entrada de 50 ng/PCR. Se incluyó una condición de control sin ADN plasmídico. Los resultados indican que las mutaciones observadas para las 15 muestras de FFPET analizadas se correspondían con la mutación esperada determinada por la secuenciación, independientemente de si el ADN plasmídico para el gen HER añadido está presente o no. También se

analizó la mutación L747S del exón 19 de EGFR para determinar la existencia de reactividad cruzada. Los resultados indican que la prueba **cobas** EGFR presenta reactividad cruzada con la mutación L747S del exón 19 de EGFR.

Interferencia

Se ha demostrado que los triglicéridos (37 mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹) y la hemoglobina (2 mg/ml, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹) no interfieren en la detección de la prueba **cobas** EGFR cuando la posible sustancia interferente se añade al proceso de lisis durante la preparación de la muestra.

Se ha demostrado que el albuterol (Ventolin), el ipratropium (Atrovent), la fluticasona (Flonase), la ceftazidima (Fortaz), el imipenem-cilastatina (Primaxin), la piperacilina-tazobactam (Primaxim), la cilastina (cilastatina sódica), la betadina y la lidocaína no interfieren en el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR cuando se añaden al paso de lisis durante el procedimiento de preparación de la muestra.

Tejido necrótico

Se ha demostrado que las muestras de FFPET de CPCNP con un contenido de tejido necrótico de hasta el 60 % para las muestras de EGFR mutado y el 85 % en las muestras no mutadas no interfieren en la identificación de resultados en la prueba **cobas** EGFR.

Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba **cobas** EGFR se valoró a partir de seis muestras de FFPET, que incluían: dos muestras de EGFR no mutado y cuatro muestras de EGFR mutado, una de cada: mutaciones de delección del exón 19, S768I y G719X, T790M y L858R, y de inserción del exón 20. Las muestras se analizaron por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos **cobas z** 480 analyzers durante cuatro días. Se evaluaron un total de 32 réplicas por muestra. La prueba **cobas** EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 96,9 % (186/192).

La repetibilidad de la prueba **cobas** EGFR también se evaluó en un segundo estudio en el que se utilizaron cuatro muestras de FFPET, que incluían: una muestra de EGFR no mutado y tres muestras de FFPET de EGFR mutado, una de cada: mutaciones L861Q, G719X y de inserción del exón 20. Las muestras se analizaron por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos **cobas z** 480 analyzers durante varios días. La prueba **cobas** EGFR presenta una precisión de identificación correcta del 99,2 % (127/128) para todas las réplicas de muestras, usuarios, lotes de reactivos y equipos combinados.

Reproducibilidad de la manipulación de las muestras

Se estudió la reproducibilidad del **cobas**® DNA Sample Preparation Kit mediante secciones obtenidas de tres bloques de muestras de FFPET, uno de los cuales contenía una mutación de delección del exón 19, otro, una mutación L858R y otro, ninguna mutación. Se analizó cada muestra por duplicado todos los días en cada uno de los laboratorios. Se aleatorizaron secciones de muestras de una determinada muestra y se analizaron en los tres laboratorios durante un periodo de seis días mediante un usuario en cada centro, con un **cobas z** 480 analyzer en cada centro, tres lotes del **cobas**® DNA Sample Preparation Kit y un lote del kit de la prueba **cobas** EGFR. Cada día, cada usuario aisló y analizó el ADN de dos secciones plegadas de FFPET de CPCNP para cada muestra mediante la prueba **cobas** EGFR. Todas las muestras generaron resultados válidos y correctos durante los seis días de análisis. Teniendo en cuenta todas las muestras y los usuarios, la prueba **cobas** EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 100 % (108/108).

Evaluación clínica del rendimiento

Estudio de reproducibilidad clínica 1

Se realizó un estudio externo para valorar la reproducibilidad de la prueba **cobas** EGFR en 3 laboratorios de análisis externos (2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivos y durante 5 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 13 miembros de muestras de ADN obtenidas de secciones de FFPET de muestras tumorales de CPCNP no mutado y mutado. El panel incluía la mutación L858R del exón 21 y cinco mutaciones distintas de delección del exón 19. De las 92 series, 90 (97,8 %) resultaron válidas. Se realizaron un total de 2.340 pruebas con los 13 miembros del panel en 90 series válidas. Todos los resultados obtenidos fueron válidos. No se obtuvieron resultados “Mutation Detected” para ninguna de las 180 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100 %. La concordancia fue del 100 % para 10 de los 12 miembros mutados del panel. Para el miembro del panel EX19_2240_2257del18 – 5 % de mutación, la concordancia fue del 62,8 % (67 de los 180 resultados de la prueba generaron un resultado “No Mutation Detected”). Para el miembro del panel EX19_2240_2257del18 – 10 % de mutación, la concordancia fue del 99,4 % (1 de los 180 resultados de la prueba generó un resultado “No Mutation Detected”). En la Tabla 11 se muestran los resultados de concordancia general. El coeficiente de variación (CV) fue < 6 % para todos los miembros del panel de mutación. Para cada miembro del panel, el CV fue < 3,5 %. Para el control externo, el CV general fue < 1,3 %. El porcentaje del CV entre lotes fue < 0,5 % y < 1,2 % intralote.

Tabla 11 Estimaciones de concordancia general por miembros del panel en el estudio 1 de reproducibilidad de la prueba cobas EGFR

| Miembro del panel | Número de pruebas válidas | Concordancia (N) | % de concordancia (IC del 95 %) ^a |
|--|---------------------------|------------------|--|
| No mutado | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2235_2249del15 - 5 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2235_2249del15 - ≤ 10 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2236_2250del15 - 5 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2236_2250del15 - ≤ 10 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2239_2248>C - 5 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2239_2248>C - ≤ 10 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2240_2254del15 - 5 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2240_2254del15 - ≤ 10 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX19_2240_2257del18 - 5 % de mutación | 180 | 113 | 62,8 (55,3, 69,9)* |
| EX19_2240_2257del18 - ≤ 10 % de mutación | 180 | 179 | 99,4 (96,9, 100,0)* |
| EX21_2573T>G=L858R - 5 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| EX21_2573T>G=L858R - ≤ 10 % de mutación | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |

Nota: se considera que existe concordancia de resultados cuando un miembro mutado del panel genera un resultado “Mutation Detected” válido o cuando un miembro no mutado del panel genera un resultado “No Mutation Detected” válido.

^a IC del 95 % = Intervalo de confianza binomial exacto del 95 %.

* La sensibilidad analítica de la prueba **cobas** EGFR para la detección de esta mutación supera el nivel de mutación del 10 % si se utiliza el volumen estándar de 50 ng por pocillo de reacción.

Estudio de reproducibilidad clínica 2

Se realizó un estudio externo para valorar la reproducibilidad de la prueba cobas EGFR en 3 laboratorios de análisis (2 externos y uno interno, con 2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivo y durante 5 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 11 miembros de muestras de ADN obtenidas de secciones de FFPET de muestras tumorales de CPCNP no mutado y mutado. El panel incluía la mutación G719X del exón 18, la mutación T790M del exón 20, la mutación S768I del exón 20, la mutación de inserción en el exón 20 y la mutación L861Q del exón 21. De las 91 series, 90 (98,9 %) resultaron válidas. Se realizó un total de 1.980 pruebas por duplicado con los 11 miembros del panel en 90 series válidas. Todos los resultados obtenidos fueron válidos. No se obtuvieron resultados “Mutation Detected” para ninguna de las 180 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100 %. La concordancia fue del 100 % para todos los miembros del panel mutados, excepto para el miembro del panel “Inserción en el exón 20 – LoD”. En la Tabla 12 a continuación se muestran los resultados de concordancia general. El coeficiente de variación (CV) fue < 9,2 % para todos los miembros mutados del panel. Para el control externo, el CV general fue ≤ 1,3 %. El CV entre lotes fue ≤ 0,6 % y ≤ 1,1 % intralote.

Tabla 12 Estimaciones de concordancia general por miembros del panel en el estudio 2 de reproducibilidad de la prueba cobas EGFR

| Miembro del panel | Número de pruebas válidas | Concordancia (N) | % de concordancia (IC del 95 %)* |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------|----------------------------------|
| No mutado | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 18 G719X – LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 20 T790M – LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 20 S768I – LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 – LoD | 180 | 166 | 92,2 (87,3, 95,7) |
| Exón 21 L861Q – LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 18 G719X – 2 × LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 20 T790M – 2 × LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 20 S768I – 2 × LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 – 2 × LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |
| Exón 21 L861Q – 2 × LoD | 180 | 180 | 100 (98,0, 100,0) |

Nota: se considera que existe concordancia de resultados cuando un miembro mutado del panel genera un resultado válido de mutación detectada para una mutación diana o cuando un miembro no mutado del panel genera un resultado “No Mutation Detected” válido.

* IC del 95 % = intervalo de confianza binominal exacto del 95 %.

IC = intervalo de confianza; LoD = límite de detección; NMD = resultado “No Mutation Detected”

Correlación con el método de referencia con muestras de la fase III del estudio EURTAC

El rendimiento clínico de la prueba **cobas** EGFR se determinó mediante comparación con dos métodos de referencia (secuenciación bidireccional doble Sanger y secuenciación cuantitativa de próxima generación [NGS]) y 487 muestras de tumor pulmonar impregnadas en parafina y fijadas en formalina de pacientes con CPCNP avanzado que se cribaron para el estudio EURTAC de fase III de tratamiento con TARCEVA® (erlotinib) frente a quimioterapia basada en cisplatino.^{6, 22} Las características clínicas y demográficas de los pacientes cuyas muestras se pudieron utilizar para el análisis retrospectivo son comparables a las de otros pacientes elegibles de otro modo (557) cuyas muestras no estaban disponibles para la repetición de la prueba.

Para el estudio EURTAC se cribó un total de 1.276 pacientes mediante una combinación de pruebas desarrolladas para laboratorio, conocidas colectivamente como ensayo inmunohistoquímico de investigación (CTA). Una vez excluidos los pacientes no elegibles y aquellos sin resultados de CTA, el número de pacientes potencialmente elegibles para este estudio fue de 1.044. De estos 1.044 pacientes elegibles, 225 muestras resultaron positivas para la mutación con el ensayo CTA, 792 resultaron no mutadas con CTA y 27 generaron resultados no concluyentes con CTA. De los 1.044 pacientes que podrían ser elegibles, se pudo disponer de 487 muestras para la repetición de la prueba **cobas** EGFR.

Se llevó a cabo un análisis ciego de las 487 muestras mediante la prueba **cobas** EGFR y la secuenciación Sanger. De estas, se obtuvieron 406 resultados válidos con la prueba **cobas** EGFR y la secuenciación Sanger, 38 resultados no válidos con la prueba **cobas** EGFR y la secuenciación Sanger, 38 resultados no válidos exclusivamente con la secuenciación Sanger y 5 resultados no válidos exclusivamente con la prueba **cobas** EGFR. De las 487 muestras disponibles para la repetición de la prueba **cobas** EGFR, 444 generaron resultados válidos con la prueba **cobas** EGFR y se analizaron también con el método NGS. De estas, se obtuvieron 36 resultados no válidos mediante NGS; por lo tanto, 408 generaron resultados válidos tanto con la prueba **cobas** EGFR como con el método NGS. La precisión analítica de la prueba **cobas** EGFR comparada con cada método de referencia se determinó mediante la estimación de los porcentajes de concordancia de positivos (PCP), concordancia de negativos (PCN) y concordancia global (PCG), así como sus correspondientes IC del 95 % para las delecciones en el exón 19 y las mutaciones L858R, tanto agregados como individuales.

En la cohorte EURTAC, la prueba **cobas** EGFR detectó las mutaciones en el exón 19 y el exón 21 del gen EGFR que se indican en la Tabla 13. La Tabla 6 demuestra la sensibilidad analítica de las mutaciones detectadas en la cohorte EURTAC.

Tabla 13 Mutaciones detectadas por la prueba cobas EGFR en la cohorte EURTAC

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|--------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|
| 19 | 2235_2249del15 | E746_A750delELREA | 6223 |
| | 2236_2250del15 | E746_A750delELREA | 6225 |
| | 2239_2256del18 | L747_S752delLREATS | 6255 |
| | 2240_2257del18 | L747_P753>S | 12370 |
| | 2239_2248 TTAAGAGAAG >C | L747_A750>P | 12382 |
| | 2239_2251>C | L747_T751>P | 12383 |
| | 2237_2255>T | E746_S752>V | 12384 |
| | 2237_2253>TTGCT | E746_T751>VA | 12416 |
| | 2237_2257>TCT | E746_P753>VS | 18427 |
| | 2238_2252del15 | L747_T751delLREAT | 23571 |
| | 2236_2252>AT | E746_T751>I | 26680 |
| | 2239_2253>CAA | L747_T751>Q | 51527 |
| | 2234_2251>AAT | K745_T751>K | No identificado |
| | 2236_2244del9 | E746_R748>E | No identificado |
| | 2236_2263>GAAGCAT | E746_A755>E | No identificado |
| | 2237_2251>AAC | E746_751T>E | No identificado |
| 2239_2257>GT | L747_P753>V | No identificado | |
| 21 | 2573 T>G | L858R | 6224 |

En el análisis de concordancia se incluyeron un total de 406 muestras con resultados válidos para la prueba **cobas** EGFR y el método Sanger. El porcentaje PCP entre la prueba **cobas** EGFR y la secuenciación Sanger fue del 96,6 % (IC del 95 %: entre 91,5 % y 98,7 %) y el PCN, del 88,3 % (IC del 95 %: entre 84,1 % y 91,5 %) para la detección agregada de deleciones del exón 19 y mutaciones L858R, tal como se muestra en la Tabla 14. El porcentaje PCG fue del 90,6 %, con un límite inferior del IC del 95 % superior al 87 %. Los porcentajes PCP, PCN y PCG para la detección de mutaciones de deleción en el exón 19 fueron todos > 92 %. Los porcentajes PCP, PCN y PCG comparados para la detección de mutaciones L858R fueron todos > 95 %.

Tabla 14 Comparación entre la prueba cobas EGFR y la secuenciación Sanger para la detección de mutaciones en EGFR de deleción del exón 19 y la mutación L858R

| Mutación | Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|------------------------|---|--------------------------------|----------------|
| Deleción en el exón 19 | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 97,3 % (71/73) | 90,5 %, 99,2 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 92,5 % (308/333) | 89,2 %, 94,9 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 93,3 % (379/406) | 90,5 %, 95,4 % |
| L858R | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 95,3 % (41/43) | 84,5 %, 98,7 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 97,5 % (354/363) | 95,4 %, 98,7 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 97,3 % (395/406) | 95,2 %, 98,5 % |
| Agregado | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 96,6 % (112/116) | 91,5 %, 98,7 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 88,3 % (256/290) | 84,1 %, 91,5 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 90,6 % (368/406) | 87,4 %, 93,1 % |

En el análisis de concordancia se incluyeron un total de 408 muestras con resultados válidos para la prueba **cobas** EGFR y el método NGS. En comparación, los porcentajes PCP y PCN agregados entre la prueba **cobas** EGFR y la secuenciación NGS para la detección de deleciones del exón 19 y la mutación puntual L858R fueron del 94,0 % (IC del 95 %: entre 89,1 % y 96,8 %) y del 97,7 % (IC del 95 %: entre 95,0 % y 98,9 %) respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 15. El porcentaje PCG fue del 96,3 %, con un límite inferior de IC del 95 % del 94,0 %. Los porcentajes PCP, PCN y PCG para la detección de mutaciones de deleción del exón 19 fueron todos > 95 %, con todos los límites inferiores del IC del 95 % > 90 %. Los porcentajes PCP, PCN y PCG para la detección de la mutación L858R también fueron todos > 95 %, con todos los límites inferiores del IC del 95 % \geq 95 %, a excepción del porcentaje PCP (90 %), debido al reducido número de mutaciones L858R detectadas.

Tabla 15 Comparación entre la prueba cobas EGFR y el método NGS para la detección de mutaciones por deleción en el exón 19 y la mutación L858R de EGFR

| Mutación | Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|------------------------|---|--------------------------------|----------------|
| Deleción en el exón 19 | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 95,9 % (94/98) | 90,0 %, 98,4 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 99,7 % (309/310) | 98,2 %, 99,9 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 98,8 % (403/408) | 97,2 %, 99,5 % |
| L858R | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 90,6 % (48/53) | 79,7 %, 95,9 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 98,6 % (350/355) | 96,7 %, 99,4 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 97,5 % (398/408) | 95,5 %, 98,7 % |
| Agregado | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 94,0 % (142/151) | 89,1 %, 96,8 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 97,7 % (251/257) | 95,0 %, 98,9 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 96,3 % (393/408) | 94,0 %, 97,8 % |

Correlación con el método de referencia con muestras de fase II del estudio AURA2

Se valoró el rendimiento clínico de la prueba **cobas** EGFR mediante comparación con una plataforma de secuenciación de próxima generación (NGS) validada y 383 muestras de cáncer de pulmón impregnadas en parafina y fijadas en formalina de pacientes con CPCNP avanzado sometidos a cribado mediante la prueba **cobas** EGFR en la fase II del estudio AURA2 de TAGRISSO® (osimertinib).

Se cribó un total de 472 pacientes para el ensayo AURA2 mediante la prueba **cobas** EGFR. Una vez excluidos los pacientes no aptos, quedaron 383 pacientes aptos para este estudio.

Se llevó a cabo un análisis ciego de las 383 muestras mediante la prueba **cobas** EGFR y un método NGS validado. De todas las muestras, 368 obtuvieron resultados válidos tanto con la prueba **cobas** EGFR como con el método NGS. Se detectó un total de 2 resultados no válidos tanto con la prueba **cobas** EGFR como con el método NGS, 2 resultados no válidos solamente con el método NGS y 11 resultados no válidos solamente con la prueba **cobas** EGFR. La precisión analítica de la prueba **cobas** EGFR comparada con el método de referencia, NGS, para la detección de la mutación T790M se evaluó mediante la estimación del porcentaje de concordancia de positivos (PCP), el porcentaje de concordancia de negativos (PCN) y el porcentaje de concordancia global (PCG), además de sus IC del 95 % correspondientes para la mutación T790M.

En el estudio AURA2, la prueba **cobas** EGFR detectó las mutaciones del gen EGFR que se indican en la Tabla 16. La Tabla 6 demuestra la sensibilidad analítica de las mutaciones detectadas en el estudio AURA2.

Tabla 16 Mutaciones detectadas por la prueba cobas EGFR en la cohorte AURA2

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|---------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| 18 | 2156G>C | G719A | 6239 |
| | 2155G>A | G719S | 6252 |
| | 2155G>T | G719C | 6253 |
| 19 | 2239_2247delTTAAGAGAA | L747_E749delLRE | 6218 |
| | 2235_2249del15 | E746_A750delELREA | 6223 |
| | 2236_2250del15 | E746_A750delELREA | 6225 |
| | 2239_2256del18 | L747_S752delLREATS | 6255 |
| | 2240_2254del15 | L747_T751delLREAT | 12369 |
| | 2240_2257del18 | L747_P753>S | 12370 |
| | 2239_2248 TTAAGAGAAG>C | L747_A750>P | 12382 |
| | 2239_2251>C | L747_T751>P | 12383 |
| | 2237_2255>T | E746_S752>V | 12384 |
| | 2237_2251del15 | E746_T751>A | 12678 |
| | 2235_2248>AATTC | E746_A750>IP | 13550 |
| | 2235_2252>AAT | E746_T751>I | 13551 |
| | 2253_2276del24 | S752_I759delSPKANKEI | 13556 |
| 2237_2257>TCT | E746_P753>VS | 18427 | |
| 20 | 2369C>T | T790M | 6240 |
| | 2303G>T | S768I | 6241 |
| 21 | 2573T>G | L858R | 6224 |
| | 2573_2574TG>GT | L858R | 12429 |
| | 2582T>A | L861Q | 6213 |

En el análisis de concordancia se incluyeron un total de 368 muestras con resultados válidos para la prueba **cobas** EGFR y el método NGS. El PCP entre la prueba **cobas** EGFR y el método NGS fue del 88,3 % (IC del 95 %: 83,8 % a 91,7 %), el

PCN fue de 97,3 % (IC del 95 %: 92,4 % a 99,1 %) y el PCG fue del 91,0 % (IC del 95 %: 87,7 % a 93,5 %) para la detección de la mutación T790M tal y como se muestra en la Tabla 17. 30 muestras resultaron positivas con el método NGS y negativas con la prueba cobas EGFR: en 10/30 muestras, el porcentaje de mutación T790M determinado por el método NGS fue inferior al LoD (< 2 % mutación) de la prueba cobas EGFR. En 20 de las 30 muestras se obtuvo un valor de Ct del IC con demora que indica una tasa de amplificación escasa de la plantilla de ADN.

Tabla 17 Comparación entre la prueba cobas EGFR y el método NGS para la detección de la mutación T790M del gen EGFR

| Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|---|--------------------------------|----------------|
| Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 88,3 % (226/256) | 83,8 %, 91,7 % |
| Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 97,3 % (109/112) | 92,4 %, 99,1 % |
| Porcentaje de concordancia global (PCG) | 91,0 % (335/368) | 87,7 %, 93,5 % |

Datos de los resultados clínicos

EURTAC

El estudio EURTAC²² fase III es un estudio abierto, multicéntrico y aleatorizado del tratamiento con TARCEVA® (erlotinib) frente a la quimioterapia doble con platino como primera línea de tratamiento para pacientes con CPCNP avanzado cuyos tumores presenten deleciones en el exón 19 del gen EGFR o mutaciones por sustitución del exón 21 (L858R) y que no han recibido quimioterapia, según un ensayo inmunohistoquímico (CTA). El estudio se llevó a cabo gracias al patrocinio del Grupo Español de cáncer de pulmón (GCEP). En el estudio participaron un total de 174 pacientes. Los resultados del estudio muestran que los pacientes tratados con TARCEVA® presentan un incremento estadísticamente significativo de la tasa de supervivencia libre de progresión (SLP) (SLP media de 10,4 meses vs. 5,1 meses) en comparación con los pacientes tratados con quimioterapia, con un cociente de riesgos de 0,34 ($p < 0,0001$, IC del 95 % [0,23; 0,49]). La tasa de respuesta de los pacientes tratados con TARCEVA® fue superior a la de los pacientes tratados con quimioterapia (65,1 % vs. 16,1 %). En cambio, no se observaron diferencias significativas en la tasa de supervivencia global (TSG) entre ambos grupos de tratamiento, ya que un 76 % de los pacientes tratados con quimioterapia estándar pasaron a ser tratados con TARCEVA®.

De los 174 pacientes que participaron en el estudio EURTAC, 134 casos (el 77 % de la población del estudio, incluidos 69 pacientes del grupo de TARCEVA® y 65 pacientes del grupo de quimioterapia) estuvieron disponibles para repetir la prueba y se analizaron retrospectivamente con la prueba cobas EGFR. De los 134 casos que se volvieron a analizar con la prueba cobas EGFR, 116 (59 pacientes del grupo de TARCEVA® y 57 pacientes del grupo de quimioterapia) generaron un resultado "Mutation Detected" con la prueba cobas EGFR. El análisis del subconjunto de estas 116 muestras revela que los pacientes tratados con TARCEVA® presentaron un incremento significativo de la SLP (SLP media de 10,4 vs. 5,4 meses) y tenían menos probabilidades de padecer una enfermedad progresiva o fallecer (CR = 0,34, IC del 95 % [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) que los pacientes sometidos a quimioterapia (Ilustración 3). La tasa de respuesta del grupo de tratamiento con TARCEVA® fue superior en comparación con el grupo de quimioterapia (59,3 % vs. 14,0 %). No se observaron diferencias significativas de la TSG entre ambos grupos. El beneficio clínico observado en el subconjunto de pacientes analizados con la prueba cobas EGFR fue comparable al observado en la población total del estudio (Tabla 18).

Se realizó un análisis de eficacia adicional para valorar los pacientes cuyo resultado fue positivo para la prueba cobas EGFR y negativo o no válido para el ensayo CTA. En el peor de los escenarios (un cociente de riesgos de 1 para pacientes con resultados positivos para la prueba cobas EGFR y negativos para el ensayo CTA), los datos indican un cociente de riesgos de 0,42 (IC del 95 % [0,26; 0,57]).

Ilustración 3 Gráfico de estimación Kaplan-Meier de la SLP por tratamiento para pacientes con mutación detectada mediante la prueba cobas EGFR (valoración del investigador)

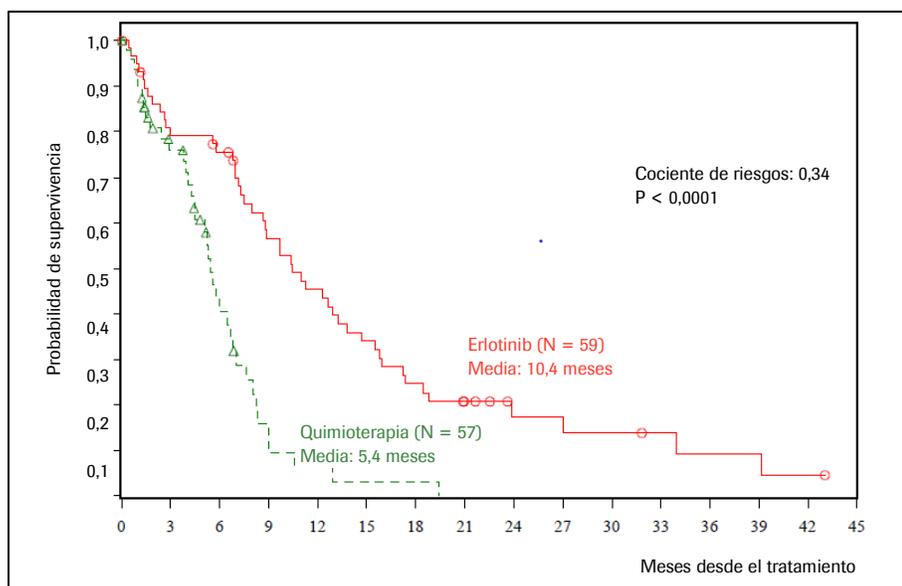


Tabla 18 El beneficio clínico de pacientes analizados con la prueba cobas EGFR es comparable con el observado en la población del estudio EURTAC

| Parámetro | Población positiva según la prueba cobas EGFR n = 116 | | EURTAC n = 173* | |
|---------------------------------------|--|---------------------|-------------------------|---------------------|
| | Quimioterapia n = 57 | Erlotinib n = 59 | Quimioterapia n = 87 | Erlotinib n = 86 |
| SLP | | | | |
| Media (meses) | 5,4 | 10,4 | 5,1 | 10,4 |
| Cociente de riesgos | 0,34 | | 0,34 | |
| Cociente de riesgos IC del 95 % | [0,21; 0,54] | | [0,23; 0,49] | |
| Valor p (prueba de rango logarítmico) | < 0,0001 | | < 0,0001 | |

* Un paciente retiró su consentimiento tras la finalización del estudio EURTAC, por lo que el conjunto de datos es n = 173.

Estudio AURA2

El estudio AURA2²³ de fase II es un estudio abierto, multicéntrico y de un único grupo cuya finalidad es valorar la seguridad y la eficacia de TAGRISSO® (osimertinib) como tratamiento de segunda o ≥ tercera línea para pacientes con CPCNP avanzado cuya enfermedad haya empeorado después del tratamiento con un agente TKI aprobado para el gen EGFR. Todos los pacientes tenían que padecer un CPCNP positivo para la mutación T790M según la prueba cobas EGFR. La principal medida de resultado de eficacia fue la tasa de respuesta objetivo (TRO) según RECIST 1.1 evaluada por el Comité de Revisión Independiente Ciego (BICR) con el grupo de análisis evaluable de respuesta. La TRO se definió como el número (%) de pacientes con un mínimo de una visita y un resultado de respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP) confirmada como mínimo 4 semanas más tarde (es decir, una tasa objetivo óptima [TOO] de RC o RP).

De los 472 pacientes sometidos a cribado para el estudio AURA2, 383 resultaron aptos para el análisis con la prueba cobas EGFR. De todos los aptos, se seleccionaron 233 pacientes positivos para la mutación T790M como miembros para el estudio AURA2, de los cuales acabaron participando 210 a los que se les administró TAGRISSO® (grupo completo de análisis [GCA]).

La Tabla 19 que figura a continuación presenta las tasas TRO según el BICR y la valoración del investigador en el estudio AURA2. De los 210 pacientes tratados con al menos una dosis de TAGRISSO® (GCA), 128 obtuvieron respuesta según el BICR, con una TRO del 61,0 % (IC del 95 %: 54,0 % a 67,6 %), y 135 según la valoración del investigador con una TRO del 64,3 % (IC del 95 %: 57,4 % a 70,8 %).

Se volvieron a analizar los 383 pacientes aptos para el estudio AURA2 mediante la prueba cobas EGFR. De los 233 pacientes positivos para la mutación T790M y seleccionados para el estudio AURA2, 225 generaron un resultado positivo para T790M con la prueba cobas EGFR y 204 figuraban en el GCA.

De los 204 pacientes tratados con TAGRISSO® (GCA), 127 volvieron a responder positivamente según el BICR, con una TRO del 62,3 % (IC del 95 %: 55,2 % a 68,9 %), y 133 según la valoración del investigador, con una TRO del 65,2 % (IC del 95 %: 58,2 % a 71,7 %).

Tabla 19 Beneficio clínico de los pacientes positivos para la mutación T790M analizados con la prueba cobas EGFR en el estudio AURA2

| Grupo de análisis | Valoración de | Estudio AURA2 | | | Prueba cobas EGFR (IVD) Positivos para T790M | | |
|----------------------------------|--|---------------|--|----------------------------|---|--|----------------------------|
| | | N | Número de pacientes con respuesta confirmada | TRO (IC del 95 %) | N | Número de pacientes con respuesta confirmada | TRO (IC del 95 %) |
| Grupo completo de análisis (GCA) | Comité de Revisión Independiente Ciego | 210 | 128 | 61,0 % (54,0 %, 67,6 %) | 204 | 127 | 62,3 % (55,2 %, 68,9 %) |
| | Investigador | | 135 | 64,3 % (57,4 %, 70,8 %) | | 133 | 65,2 % (58,2 %, 71,7 %) |

FLAURA

I. Ensayo de fase III para TAGRISSO® como tratamiento de primera línea

El ensayo FLAURA¹⁰ es un ensayo clínico de fase III, a doble ciego y aleatorizado que permite evaluar la eficacia y seguridad de TAGRISSO® con relación al estándar de atención (SoC: EGFR con TKI [gefitinib o erlotinib]) como tratamiento de primera línea en pacientes con CPCNP localmente avanzado o metastásico que no habían recibido tratamiento sistémico previo para la enfermedad avanzada y cuyos tumores presentaban mutaciones sensibilizadoras de EGFR confirmadas local o centralmente (mutaciones de sustitución Ex19del o L858R), denominadas de forma conjunta EGFRm positivo. El principal criterio de valoración del estudio FLAURA fue la supervivencia de libre progresión (SLP) basada en la valoración del investigador realizada sobre los pacientes del grupo completo de análisis (GCA: todos los pacientes globalmente aleatorizados).

Se cribó un total de 994 pacientes para la aleatorización en el estudio, 809 de los cuales presentaron muestras con tejido tumoral que se sometieron a análisis mediante la prueba cobas EGFR central de forma prospectiva en el cribado o retrospectiva. De los 556 pacientes aleatorizados (289 de ellos a partir de una prueba de tejido cobas central y 267 a partir de una prueba local), se confirmó que 500 presentaban un resultado positivo para la prueba cobas EGFRm. De los 267 pacientes aleatorizados a partir de una prueba local, 211 presentaron un resultado positivo confirmado para la prueba cobas EGFRm, 41 no obtuvieron ningún resultado para la prueba cobas debido a la falta de muestra o a una muestra inadecuada, 9 generaron un resultado no válido para la prueba cobas y 6 obtuvieron un resultado “No Mutation Detected” para la prueba cobas.

La Tabla 20 que figura a continuación presenta el CR de la SLP según la valoración del investigador efectuada sobre el grupo completo de análisis y la población del dispositivo primario (pacientes con un resultado positivo para una prueba de tejido cobas EGFRm central). El CR de la SLP según la valoración del investigador para el grupo completo de análisis

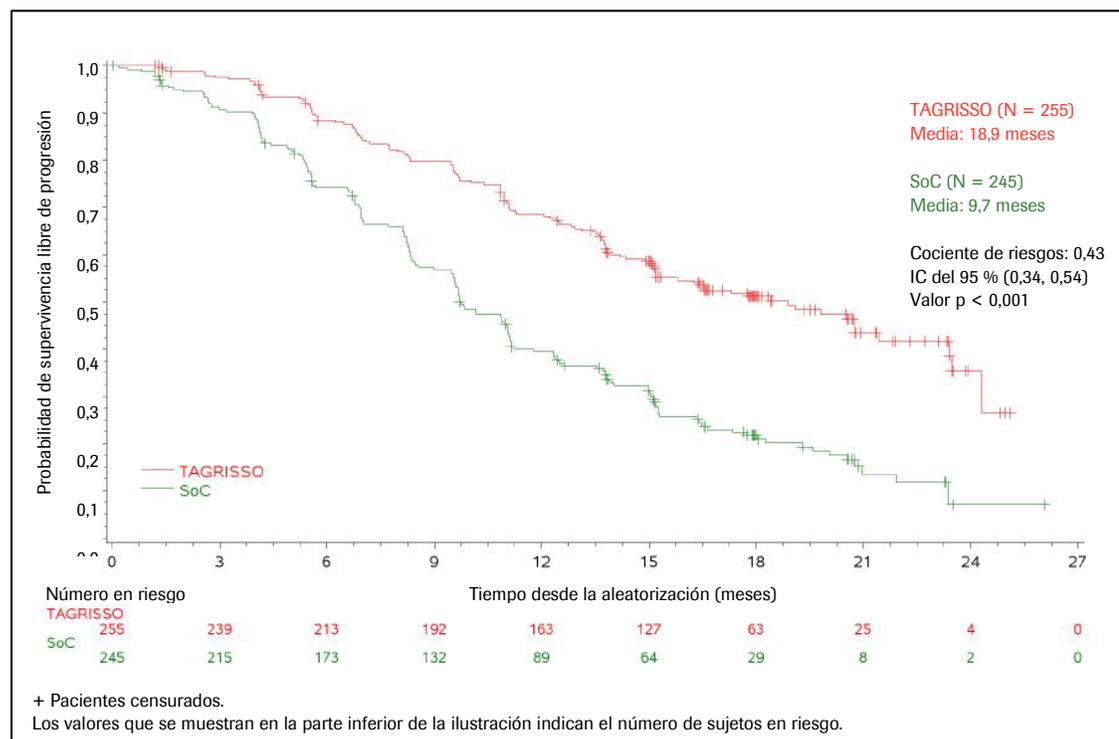
(N = 556), que se basa en una prueba de rango logarítmico estratificada, fue del 0,46 (IC del 95 %: 0,37; 0,57). Se obtuvo la misma estimación puntual a partir de un modelo de riesgos proporcionales de Cox no ajustado. El CR de la SLP según la valoración del investigador para la población del dispositivo primario (N = 500), calculado a partir de un modelo de riesgos proporcionales de Cox no ajustados, fue del 0,43 (IC del 95 %: 0,34; 0,54). La eficacia clínica observada en la población del dispositivo primario fue coherente con la del grupo completo de análisis. La curva de Kaplan-Meier de la SLP según la valoración del investigador en la población del dispositivo primario se presenta en la Ilustración 4.

Tabla 20 Supervivencia libre de progresión según la valoración del investigador para el grupo completo de análisis de FLAURA y para la población del dispositivo primario (positiva según la prueba cobas EGFR)

| | Grupo completo de análisis de FLAURA N = 556 | | Población positiva según la prueba cobas EGFR de FLAURA (población del dispositivo primario) N = 500 | |
|--|---|------------------------------------|--|------------------------------------|
| | Osimertinib (N = 279) | Gefitinib o Erlotinib (N = 277) | Osimertinib (N = 255) | Gefitinib o Erlotinib (N = 245) |
| SLP | | | | |
| Número de eventos (%) | 136 (49) | 206 (74) | 124 (49) | 188 (77) |
| Mediana de SLP en meses (IC del 95 %) | 18,9 (15,2, 21,4) | 10,2 (9,6, 11,1) | 18,9 (15,2, 21,4) | 9,7 (9,5, 11,0) |
| Cociente de riesgos (IC del 95 %) ^a | 0,46 (0,37, 0,57) | | 0,43 (0,34, 0,54) | |
| Valor p bilateral ^a | < 0,0001 | | < 0,001 | |

^a Modelo de riesgos proporcionales de Cox no ajustado

Ilustración 4 Gráfico de Kaplan-Meier de la SLP por tratamiento para pacientes con una mutación detectada mediante la prueba cobas EGFR (valoración del investigador) en FLAURA



II. Análisis del estándar de atención de IRESSA®

Se llevó a cabo un análisis independiente de los pacientes tEGFR+ tratados con IRESSA® (gefitinib) en el grupo de control del estudio FLAURA. De un total de 178 pacientes tratados con IRESSA®, 174 presentaron una respuesta objetiva valorada por el investigador (TRO = 67,8 % [118/174, IC del 95 %: 60,6 % y 74,3 %, POP0 en la Tabla 21]).

De los 79 pacientes tratados con IRESSA® y aleatorizados mediante una prueba de tejido cobas central (la población de eficacia primaria), 57 obtuvieron una respuesta objetiva con una TRO del 72,2 % (IC del 95 %: 61,4 % y 80,8 %; POP1 en la Tabla 21).

El efecto del tratamiento con IRESSA®, basado en la prueba de tejido cobas, se mantuvo en otras poblaciones de pacientes con TRO que oscilaban entre el 64,2 % (POP2, participantes en la prueba local y pacientes cobas tEGFR+) y el 68,5 % (POP3, todos los pacientes cobas tEGFR+) (Tabla 21 y Ilustración 5). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en el estudio de registro original (IFUM) para pacientes seleccionados para IRESSA®.¹³

Tabla 21 Resultados de TRO para diferentes poblaciones de pacientes según la prueba cobas EGFR en tejido

| Respuesta objetiva | Pacientes aleatorizados en el grupo del SoC tratados con IRESSA® | | | | |
|-----------------------|--|---|--------------|---|---|
| | Aleatorizados centralmente (cobas tEGFR+) | Aleatorizados localmente (tEGFR+ local) | | | Total |
| | | cobas tEGFR+ | cobas tEGFR- | cobas tEGFR No válido/Desconocido | |
| N.º de pacientes | 79 | 70 | 2 | 23 | 174 |
| Respuesta | 57 | 45 | 1 | 15 | 118 |
| Sin respuesta | 22 | 25 | 1 | 8 | 56 |
| TRO (% , IC del 95 %) | POP1 = 72,2 % (57/79: 61,4 %, 80,8 %) | POP4 = 64,3 % (45/70: 52,6 %, 74,5 %) | - | POP5 = 65,2 % (15/23: 44,9 %, 81,2 %) | POP0 = 67,8 % (118/174: 60,6 %, 74,3 %) |
| | - | POP2 = 64,2 % (61/95: 54,2 %, 73,1 %) | | | - |
| | POP3 = 68,5 % (102/149: 60,6 %, 75,4 %) | | - | - | - |

Nota: se excluyeron los pacientes que no ofrecieron una respuesta objetiva.

Nota: tEGFR = tejido EGFR; IC = (porcentaje) intervalo de confianza).

POP: población (subgrupo).

POP1: TRO para pacientes aleatorizados mediante la prueba de tejido cobas (población de eficacia primaria para la prueba de tejido cobas).

POP2: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local.

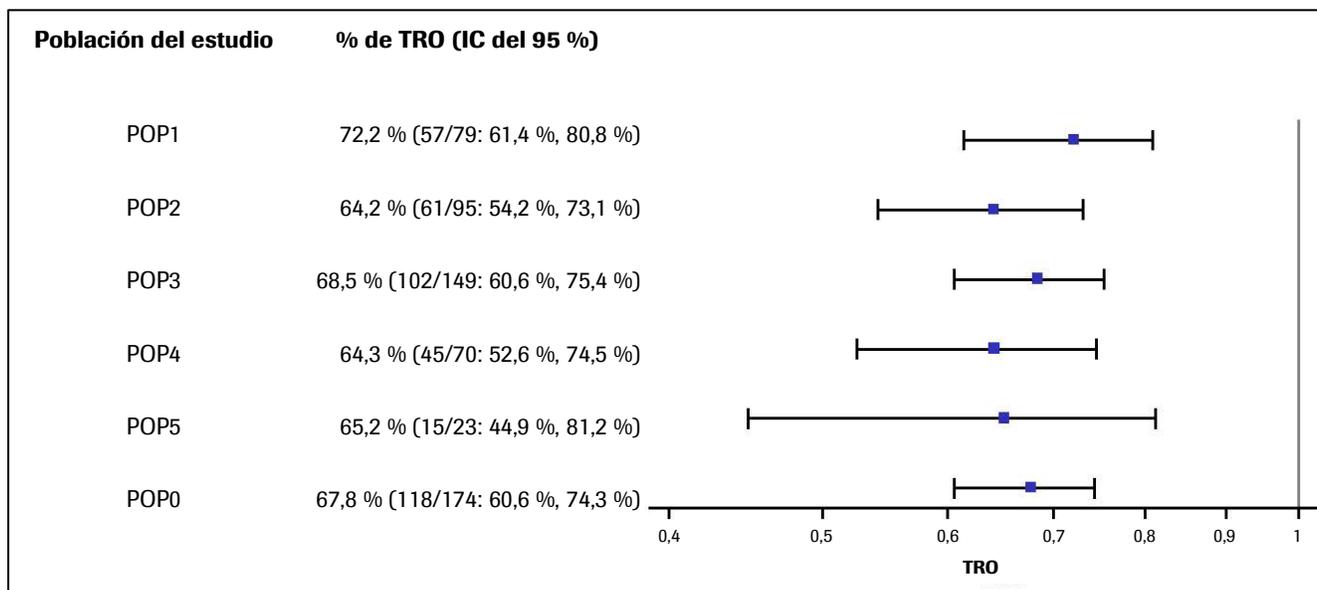
POP3: TRO para pacientes positivos mediante la prueba de tejido cobas.

POP4: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local y confirmados mediante la prueba de tejido cobas.

POP5: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local con un resultado no válido obtenido mediante la prueba de tejido cobas o sin análisis realizado mediante esta prueba.

POP0: TRO para todos los pacientes tratados con IRESSA®.

Ilustración 5 Diagramas de bosque de TRO según la prueba cobas EGFR en tejido para diferentes poblaciones



POP: población (subgrupo).

POP1: TRO para pacientes aleatorizados mediante la prueba de tejido **cobas** (población de eficacia primaria para la prueba de tejido **cobas**).

POP2: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local.

POP3: TRO para pacientes positivos mediante la prueba de tejido **cobas**.

POP4: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local y confirmados mediante la prueba de tejido **cobas**.

POP5: TRO para pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local con un resultado no válido obtenido mediante la prueba de tejido **cobas** o sin análisis realizado mediante esta prueba.

POP0: TRO para todos los pacientes tratados con IRESSA®.

APARTADO B: PARA USO CON MUESTRAS DE PLASMA

Preparación de las muestras

Consulte el cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) para el aislamiento de ADN en muestras de plasma.

Materiales y reactivos

Materiales y reactivos suministrados

| Kit/Casetes | Componentes e ingredientes de los reactivos | Cantidad por prueba | Símbolo de seguridad y advertencia |
|--|--|---------------------|------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 pruebas (M/N: 07248563190) | EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N: 06471366001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |
| | EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N: 06471382001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |

| Kit/Casetes | Componentes e ingredientes de los reactivos | Cantidad por prueba | Símbolo de seguridad y advertencia |
|---|---|---------------------|------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 pruebas (M/N: 07248563190) | EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N: 07248601001) Buffer Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13 % de sulfóxido de dimetilo 0,09 % de azida sódica < 0,10 % de dNTP < 0,01 % de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01 % de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01 % de aptámero < 0,01 % de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01 % de sondas EGFR con marcador fluorescente | 2 × 0,48 ml | N/A |
| | MGAC (Acetato de magnesio) (M/N: 05854326001) Acetato de magnesio 0,09 % de azida sódica | 6 × 0,2 ml | N/A |
| | EGFR MC (Control de mutación en EGFR) (M/N: 06471455001) Buffer Tris EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05 % de azida sódica < 0,1 % de ADN plasmídico que contiene secuencias del exón 18, 19, 20 y 21 del EGFR (microbianas) < 0,1 % de ADN EGFR no mutado (cultivo celular) | 6 × 0,1 ml | N/A |
| | DNA SD (Diluyente para muestras de ADN) (M/N: 05854474001) Buffer Tris-HCl 0,09 % de azida sódica | 2 × 3,5 ml | N/A |

Almacenamiento y manipulación de los reactivos

| Reactivo | Temperatura de almacenamiento | Periodo de almacenamiento |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| cobas® EGFR Mutation Test v2* | Entre 2 °C y 8 °C | Una vez abierto, se mantiene estable para 4 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero. |

* Los reactivos **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** y la solución MMX de trabajo (preparada añadiendo **MGAC** a **EGFR MMX-1** o **EGFR MMX-2** o **EGFR MMX-3 v2**) deben protegerse de la exposición a la luz. La mezcla MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la mezcla MMX de trabajo.

Material adicional necesario

| Materiales | P/N |
|--|---------------------------------------|
| cobas® cfDNA Sample Preparation Kit | Roche M/N 07247737190 |
| Lejía | Cualquier proveedor |
| Etanol al 70 % | Cualquier proveedor |
| Pipetas serológicas estériles y desechables de 5 ml y 25 ml | Cualquier proveedor |
| Microplaca (placa de amplificación y detección) y película de sellado para el cobas® 4800 System | Roche 05232724001 |
| Aplicador de película de sellado para el cobas® 4800 System (suministrado con la instalación del cobas® 4800 System) | Roche 04900383001 |
| Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl) | Cualquier proveedor |
| Puntas de pipeta exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo | Cualquier proveedor |
| Microcentrífuga de mesa de trabajo* (centrifugado a 20.000 × g) | Eppendorf 5430 o 5430R, o equivalente |
| Congelador que permita el almacenamiento de -25 °C a -15 °C | Cualquier proveedor |
| Tubos para microcentrífuga con tapa de bloqueo (capacidad de 1,5 ml, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR) | Cualquier proveedor |
| Bandejas de tubos para microcentrífuga y cónicos | Cualquier proveedor |
| Agitador vórtex* | Cualquier proveedor |
| Guantes de laboratorio sin talco desechables | Cualquier proveedor |

* Debe realizarse el mantenimiento del equipo de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Equipos y programas necesarios pero no suministrados

| Equipos y programas necesarios, no suministrados |
|---|
| cobas z 480 analyzer |
| Unidad de control del cobas® 4800 System con versión 2.1 o posterior del programa |
| Software del paquete de análisis de plasma EGFR versión 1.0 o posterior |
| Lector de códigos de barras ext. por USB |
| Impresora |

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

- Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.

- Esta prueba se ha diseñado para ser utilizada con muestras de plasma de CPCNP. Las muestras deben tratarse como material infeccioso y, como tal, deben aplicarse las buenas prácticas de laboratorio descritas en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ y en el documento M29-A4 del CLSI.¹⁷
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas exentas de DNasa.

Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5 % en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70 %.

Nota: la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para la prueba **cobas** EGFR, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección. Para evitar la contaminación de la solución Master Mix de trabajo con muestras de ADN, el área de trabajo de amplificación y detección debería limpiarse exhaustivamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo.

Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.

- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Eliminación de residuos

- Los reactivos **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC y DNA SD** contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

Limpieza de derrames

- Si el derrame se produce sobre el **cobas® 4800 instrument**, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en el Manual de usuario correspondiente del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el **cobas z 480 analyzer**. Limpie el **cobas z 480 analyzer** según las instrucciones detalladas en el Manual de usuario correspondiente del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del **cobas z 480 analyzer**, consulte el Manual de usuario del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System**.

Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.

Recogida y manipulación de muestras

Roche Cell-Free DNA Collection Tube

El plasma de sangre total recogida en Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (tubos Roche cfDNA) ha sido validado para su uso con la prueba **cobas EGFR**.

El plasma debe separarse de la sangre recogida en un tubo Roche cfDNA en un plazo de 7 días a partir de la recogida. Las muestras de sangre recogidas en el tubo Roche cfDNA permanecen estables durante 7 días si se almacenan o transportan a una temperatura de 15-25 °C, con desplazamientos breves de hasta 16 horas a 15-30 °C. Tras la separación del plasma, deben almacenarse según las indicaciones del apartado **Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras** que figura a continuación.

Nota: se ha observado hemólisis en plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA. No obstante, se ha demostrado que las concentraciones de hemoglobina $a \leq 2,0$ g/l no interfieren en el rendimiento de la prueba **cobas EGFR**.

K2 EDTA Collection Tube

El plasma de sangre total recogida en tubos K2 EDTA ha sido validado para su uso con la prueba **cobas EGFR**.

La sangre total recogida en K2 EDTA puede almacenarse hasta 8 horas a ≤ 30 °C. Tras la separación de plasma, debe almacenarse según las indicaciones del apartado **Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras** que figura a continuación.

Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

El transporte de las muestras de plasma debe cumplir la reglamentación nacional, federal, estatal y local para el transporte de agentes etiológicos.¹⁸

Estabilidad de las muestras de plasma:

| Temperatura de almacenamiento de las muestras de plasma | ≤ -70 °C | Entre -15 °C y -25 °C | Entre 2 °C y 8 °C | Entre 15 °C y 30 °C |
|--|----------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| Tiempo de almacenamiento para plasma recogido en Roche cfDNA | Hasta 30 días | Hasta 30 días | Hasta 7 días | Hasta 1 día |
| Tiempo de almacenamiento para plasma recogido en K2 EDTA | Hasta 12 meses | Hasta 12 meses | Hasta 3 días | Hasta 1 día |

Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

La muestra procesada (cfADN extraído) del plasma procedente de un tubo Roche cfDNA o de un tubo K2 EDTA permanece estable en las condiciones siguientes:

| Temperatura de almacenamiento del cfADN extraído | Entre -15 °C y -25 °C | Entre 2 °C y 8 °C | Entre 15 °C y 30 °C |
|--|--|-------------------|---------------------|
| Periodo de almacenamiento | Hasta 2 ciclos de congelación/descongelación durante 60 días | Hasta 21 días | Hasta 7 días |

El cfADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® cfDNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

Antes de utilizar stocks de ADN extraído y almacenado, agite y centrifugue los tubos de elución que contienen dichos stocks.

Procedimiento analítico

Realización de la prueba

Ilustración 6 Flujo de trabajo de la prueba cobas EGFR con el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

| | |
|----|--|
| 1 | Inicie el sistema. |
| 2 | Efectúe el mantenimiento del equipo. |
| 3 | Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento. |
| 4 | Prepare las muestras para su unión a la columna. |
| 5 | Lleve a cabo el aislamiento del ADN. |
| 6 | Eluya el ADN. |
| 7 | Cree la petición de trabajo e imprima la distribución de la placa. |
| 8 | Prepare los reactivos de amplificación. |
| 9 | Cargue la placa de amplificación y detección con los reactivos de amplificación. |
| 10 | Cargue la placa de amplificación y detección con muestras. |
| 11 | Selle la placa de amplificación y detección. |
| 12 | Cargue la placa de amplificación y detección en el cobas z 480 analyzer . |
| 13 | Inicie la serie analítica. |
| 14 | Revise los resultados. |
| 15 | Con LIS: envíe los resultados al LIS. |
| 16 | Descargue el analizador. |

Instrucciones de uso

Nota: solo el plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA o en un tubo K2 EDTA está validado para su uso con la prueba **cobas EGFR**.

Nota: consulte el Manual del equipo del **cobas z 480 analyzer** para obtener instrucciones de uso detalladas del **cobas z 480 analyzer**.

Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada placa de amplificación y detección de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba **cobas EGFR**.

El kit de la prueba **cobas EGFR** contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

Control para todo el proceso

Esta prueba requiere un control negativo para todo el proceso. En cada serie debe procesarse un control negativo junto con las muestras empezando por el procedimiento de aislamiento de ADN.

Aislamiento de ADN

El ADN se aísla de las muestras de plasma mediante el **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit** (M/N 07247737190).

Amplificación y detección

Nota: para evitar la contaminación de las mezclas MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % y luego con una solución de etanol al 70 %. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25 %. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Configuración del equipo

Consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener instrucciones de configuración detalladas del cobas z 480.

Configuración de las peticiones de pruebas

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR, consulte el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. En una serie con solo muestras de plasma, el control de mutación se carga en las posiciones **A01-A03** de la placa. El control negativo se carga en las posiciones **B01-B03** de la placa. A continuación se añaden las muestras en conjuntos de 3 columnas, comenzando por **C01-C03** hasta **H10-H12**, tal como se muestra en la Ilustración 7.

La prueba cobas EGFR puede ejecutarse en el modo de análisis combinado (p. ej., tejido de EGFR con plasma de EGFR). Las posiciones de los controles pueden variar dependiendo de las pruebas seleccionadas y los números de muestras. Consulte el Manual de usuario del programa de la prueba cobas® EGFR Mutation Test v2, el Manual de usuario del cobas® 4800 System o la Asistencia al usuario del cobas® 4800 System para obtener más información sobre la configuración de una serie de análisis combinado.

Ilustración 7 Distribución de la placa para la prueba cobas EGFR

| Fila/Columna | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|
| A | MC MMX 1 | MC MMX 2 | MC MMX 3 v2 | S7 MMX 1 | S7 MMX 2 | S7 MMX 3 v2 | S15 MMX 1 | S15 MMX 2 | S15 MMX 3 v2 | S23 MMX 1 | S23 MMX 2 | S23 MMX 3 v2 |
| B | NEG MMX 1 | NEG MMX 2 | NEG MMX 3 v2 | S8 MMX 1 | S8 MMX 2 | S8 MMX 3 v2 | S16 MMX 1 | S16 MMX 2 | S16 MMX 3 v2 | S24 MMX 1 | S24 MMX 2 | S24 MMX 3 v2 |
| C | S1 MMX 1 | S1 MMX 2 | S1 MMX 3 v2 | S9 MMX 1 | S9 MMX 2 | S9 MMX 3 v2 | S17 MMX 1 | S17 MMX 2 | S17 MMX 3 v2 | S25 MMX 1 | S25 MMX 2 | S25 MMX 3 v2 |
| D | S2 MMX 1 | S2 MMX 2 | S2 MMX 3 v2 | S10 MMX 1 | S10 MMX 2 | S10 MMX 3 v2 | S18 MMX 1 | S18 MMX 2 | S18 MMX 3 v2 | S26 MMX 1 | S26 MMX 2 | S26 MMX 3 v2 |
| E | S3 MMX 1 | S3 MMX 2 | S3 MMX 3 v2 | S11 MMX 1 | S11 MMX 2 | S11 MMX 3 v2 | S19 MMX 1 | S19 MMX 2 | S19 MMX 3 v2 | S27 MMX 1 | S27 MMX 2 | S27 MMX 3 v2 |
| F | S4 MMX 1 | S4 MMX 2 | S4 MMX 3 v2 | S12 MMX 1 | S12 MMX 2 | S12 MMX 3 v2 | S20 MMX 1 | S20 MMX 2 | S20 MMX 3 v2 | S28 MMX 1 | S28 MMX 2 | S28 MMX 3 v2 |
| G | S5 MMX 1 | S5 MMX 2 | S5 MMX 3 v2 | S13 MMX 1 | S13 MMX 2 | S13 MMX 3 v2 | S21 MMX 1 | S21 MMX 2 | S21 MMX 3 v2 | S29 MMX 1 | S29 MMX 2 | S29 MMX 3 v2 |
| H | S6 MMX 1 | S6 MMX 2 | S6 MMX 3 v2 | S14 MMX 1 | S14 MMX 2 | S14 MMX 3 v2 | S22 MMX 1 | S22 MMX 2 | S22 MMX 3 v2 | S30 MMX 1 | S30 MMX 2 | S30 MMX 3 v2 |

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra, y MMX n.º = reactivo de Master Mix 1, 2 o 3 v2.

Nota: cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

Nota: la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo v2 se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

Nota: se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.

Configuración de las reacciones

Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)

Nota: las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MMX de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición a la luz.

Nota: debido a la viscosidad de los reactivos EGFR MMX y la mezcla MMX de trabajo, es importante pipetear con lentitud para asegurar que toda la muestra se dispensa por completo a través de la punta.

Nota: las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 y EGFR MMX-3 v2 pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.

Nota: prepare tres mezclas MMX de trabajo a granel, una con EGFR MMX-1, otra con EGFR MMX-2 y la tercera con EGFR MMX-3 v2 en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Calcule el volumen de MGAC necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 22 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

Tabla 22 Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo

| | | N.º muestras* | | | | | | | | | |
|--|-------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| MMX | 20 µl | 80 | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 240 | 260 |
| MGAC | 5 µl | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 |
| Vol. total para cada MMX de trabajo (µl) | | 100 | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250 | 275 | 300 | 325 |

* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MGAC necesario de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrífuga estéril para la mezcla MMX-1 de trabajo, MMX-2 de trabajo y MMX-3 v2 de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 al tubo de MMX de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de MGAC a los tubos de MMX de trabajo.
6. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

Nota: las muestras y los controles deben añadirse a la placa de amplificación y detección durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas MMX de trabajo.

Nota: utilice únicamente placas de amplificación y detección y películas de sellado para el cobas® 4800 System.

Preparación de la placa

Nota: si utiliza stocks de ADN almacenado, siga las instrucciones del apartado **Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras**.

1. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de amplificación y detección necesario para el análisis. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
 - Añada MMX-1 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-1**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
 - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
 - Añada MMX-3 v2 de trabajo (que contiene **EGFR MMX-3 v2**) a los pocillos de la placa de amplificación y detección de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.
2. Pipetee 25 µl de **EGFR MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03** de la placa de amplificación y detección y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

Nota: cada serie debe contener **EGFR MC** en los pocillos **A01**, **A02** y **A03**, y un control negativo **NEG** en los pocillos **B01**, **B02** y **B03**. En caso contrario, el **cobas z 480 analyzer** invalidará la serie.

Nota: cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos **C01**, **C02** y **C03** de la placa de amplificación y detección con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN de cada muestra y siga la plantilla de la Ilustración 7 hasta que todas las muestras de ADN estén cargadas en la placa de amplificación y detección. Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.

Nota: antes de utilizar stocks de ADN almacenado, agite y centrifugue los tubos de elución que contienen dichos stocks.

5. Tape la placa de amplificación y detección con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la placa de amplificación y detección.
6. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

Nota: los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla MMX de trabajo.

Inicio de la PCR

Consulte el Manual de usuario del **cobas® 4800 System** o la Asistencia al usuario del **cobas® 4800 System** para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo para EGFR. Cuando aparezca la ventana emergente “Select test”, seleccione “EGFR Plasma P1” y haga clic en el botón “OK”.

Resultados

Interpretación de los resultados

Nota: la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el **cobas® 4800 software**.

Nota: una prueba válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 23.

Tabla 23 Interpretación de los resultados de la prueba cobas EGFR

| Resultado de la prueba | Resultado de la mutación | Resultado del índice semicuantitativo (SQI) | Interpretación |
|-----------------------------|--|--|---|
| Mutation Detected | Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Puede existir más de una mutación) | Ex19Del: <i>SQI</i> S768I: <i>SQI</i> L858R: <i>SQI</i> T790M: <i>SQI</i> L861Q: <i>SQI</i> G719X: <i>SQI</i> Ex20Ins: <i>SQI</i> (Puede existir más de una mutación) | Se ha detectado una mutación en la región del EGFR diana de la prueba especificada. |
| No Mutation Detected (NMD)* | N/A | N/A | No se ha detectado ninguna mutación en las regiones del EGFR analizadas. |
| No válido | N/A | N/A | El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos que figura más adelante. |
| Erróneo | N/A | N/A | Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica. |

* Un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en las regiones del EGFR analizadas porque los resultados dependen de la concentración de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

Los avisos de resultados se muestran en la pestaña de resultados (pantalla) o en la columna de avisos (informe). Consulte el apartado **Avisos de resultados** para obtener información detallada.

Índice semicuantitativo (SQI)

El SQI es una medida semicuantitativa que indica la cantidad de cfDNA mutado presente en una muestra y que se puede utilizar para medir las diferencias de la mutación en el tiempo. Un incremento en el valor del SQI indica un incremento en la cantidad de la mutación de la diana correspondiente dentro de una muestra de origen individual, mientras que un descenso en el valor del SQI indica un descenso en la cantidad total de la mutación de la diana correspondiente dentro de una muestra de origen individual. Los resultados representativos del SQI para cada clase de mutación del EGFR detectada mediante la prueba se muestran en los resultados lineales de la Ilustración 8 a la Ilustración 14.

Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos

1. Si la serie no es válida, no habrá volumen suficiente de ADN extraído para repetir la amplificación y la detección en cada muestra. Repita el procedimiento completo de la prueba con todas las muestras, empezando por el aislamiento de ADN.
2. Si la serie es válida pero la muestra no lo es, no habrá volumen suficiente de ADN extraído para repetir la amplificación y la detección en cada muestra. Repita el procedimiento completo de la prueba con la muestra no válida, empezando por el aislamiento de ADN.

Control de calidad y validez de los resultados

Para cada serie con un máximo de 30 muestras incluye un juego de control de mutación en EGFR de **cobas** (EGFR MC) (pocillos **A01**, **A02** y **A03**) y un control negativo (NEG) (pocillos **B01**, **B02** y **B03**) para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo. Una serie se considera válida cuando los controles **EGFR MC** y **NEG** son válidos. Si **EGFR MC** o **NEG** no son válidos, toda la serie se considera no válida y debe repetirse.

Control de mutación

El resultado del control **EGFR MC** debe ser "Valid". Si los resultados de **EGFR MC** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Control negativo

El resultado del control **NEG** debe ser "Valid". Si los resultados de **NEG** no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

Limitaciones del procedimiento

1. Analice solo los tipos de muestras indicados. La prueba **cobas** EGFR ha sido validada para su uso con plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA o un tubo K2 EDTA.
2. El rendimiento de la prueba **cobas** EGFR se validó mediante el **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit.
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, la cantidad de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que el transporte, el almacenamiento y el procesamiento sean adecuados. Siga los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso, en el Manual de usuario del **cobas**® 4800 System o en la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800 System.
5. Si se pipetea desde el fondo del tubo de elución, el sedimento podría disgregarse y los resultados de la prueba podrían verse afectados.
6. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba **cobas** EGFR permite realizar una amplificación selectiva del ADN diana; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos.
7. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del **cobas**® 4800 System.
8. Solamente **cobas z** 480 analyzer se ha validado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
9. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas.
10. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.

11. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen EGFR cubiertas por los cebadores o las sondas de la prueba **cobas** EGFR pueden causar errores en la detección de la presencia de una mutación en los exones 18, 19, 20 y 21 (resultados “No Mutation Detected”).
12. La prueba **cobas** EGFR presenta reactividad cruzada (resultados “Mutation Detected”) con la mutación L747S del exón 19, una mutación adquirida poco frecuente que puede presentar resistencia al tratamiento con TKI.¹⁹
13. Las muestras analizadas con concentraciones elevadas ($> 10^5$ copias/ml) pueden generar resultados falsos.
14. La prueba **cobas** EGFR se ha validado para su uso con 25 µl de stock de ADN por pocillo de reacción. No se recomienda introducir volúmenes de stock de ADN inferiores a 25 µl por pocillo de reacción.
15. Debe seguirse el procedimiento descrito anteriormente para detectar una cantidad ≥ 100 copias de ADN mutado por ml de plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA o un tubo K2 EDTA para las mutaciones en EGFR de la Tabla 3.
16. Es posible que las muestras con resultados “No Mutation Detected” contengan mutaciones en EGFR que el ensayo no detecta.
17. Es necesario revisar los resultados “No Mutation Detected” en plasma mediante la realización de pruebas de tejidos de comprobación o confirmación.
18. El plasma procedente de sangre total recogida en un tubo Roche cfDNA es suficiente solo para una prueba puntual.
19. No debe combinarse el plasma de extracciones de pacientes no realizadas simultáneamente.
20. No se ha establecido el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR con muestras coaguladas recogidas en un tubo Roche cfDNA. Las muestras coaguladas deben rechazarse y extraerse una muestra nueva del paciente.
21. Se ha observado hemólisis en plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA. Las concentraciones de hemoglobina a $> 2,0$ g/l pueden interferir en el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR.

Evaluación no clínica del rendimiento

Rendimiento analítico

Los datos siguientes tienen como objetivo demostrar el rendimiento analítico de la prueba **cobas** EGFR.

Sensibilidad analítica – Límite de blanco

Para determinar el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR en ausencia de plantilla y garantizar que una muestra de blanco no genere una señal analítica que pueda indicar una concentración baja de mutación, se evaluaron muestras de plasma K2 EDTA procedentes de donantes sanos con EGFR no mutado. De acuerdo con el análisis descrito en la directriz EP17-A2 del CLSI²⁰, se determinó que el límite de blanco fuese cero para todas las mutaciones.

Límite de detección mediante ADN de línea celular

Plasma recogido en K2 EDTA

Se añadieron ADN de líneas celulares que contenían las siete clases de mutación detectadas por la prueba a plasma recogido en K2 EDTA de donantes sanos de EGFR no mutado. Se prepararon diluciones en serie y se analizaron 24 réplicas de cada miembro del panel utilizando cada uno de los tres lotes del kit de la prueba **cobas** EGFR.

El límite de detección se determinó para cada una de las siete clases de mutación detectadas por la prueba como la concentración de ADN más baja que generó un resultado “Mutation Detected” para EGFR de como mínimo un 95 % para la mutación analizada. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24 Límite de detección de la prueba cobas EGFR con plasma conservado en K2 EDTA

| Exón del EGFR | Grupo de mutaciones en EGFR | Secuencia de ácidos nucleicos de EGFR | LoD de ADN intacto* (copias/ml) | LoD de ADN cortado** (copias/ml) | ID de COSMIC ¹⁴ |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 18 | G719A | 2156G>C | 100 | 100 | 6239 |
| 19 | Ex19Del | 2235_2249del15 | 25 | 75 | 6223 |
| 20 | T790M | 2369C>T | 25 | 100 | 6240 |
| 20 | S768I | 2303G>T | 20 | 25 | 6241 |
| 20 | Ex20Ins | 2307_2308ins9GCCAGCGTG | 80 | 25 | 12376 |
| 21 | L858R | 2573T>G | 10 | 100 | 6224 |
| 21 | L861Q | 2582T>A | 30 | 30 | 6213 |

Las diferencias en el LoD observado se deben a la diferencia en el ADN de fondo.

* El ADN de línea celular intacto presentó un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 10.000 copias/ml.

** El ADN de línea celular, fragmentado mecánicamente a un tamaño medio de 220 bp, presentó un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 100.000 copias/ml.

Plasma recogido en Roche cfDNA

Para el plasma separado de sangre recogida en un tubo Roche cfDNA, los valores del LoD se verificaron añadiendo ADN de línea celular fragmentado con las siete clases de mutaciones detectadas por la prueba a plasma recogido en Roche cfDNA de donantes sanos de EGFR no mutado. Las diluciones se prepararon de acuerdo con las concentraciones del LoD indicadas en la Tabla 24 y se analizaron 20 réplicas de cada muestra con un lote del kit de la prueba **cobas** EGFR. La tasa de positividad observada para cada mutación fue del 100 %.

En resumen, la prueba **cobas** EGFR es capaz de detectar mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR con una cantidad de ≤ 100 copias de ADN mutado por ml de plasma si se utiliza el volumen estándar de 25 μ l de stock de ADN por pocillo de reacción con plasma recogido en K2 EDTA o en Roche cfDNA.

Reactividad cruzada con otras mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21

Muestras del ensayo clínico AURA2 y de la extensión de AURA

La prueba **cobas** EGFR generó el resultado “Mutation Detected” para las siguientes mutaciones del gen EGFR detectadas en las muestras del ensayo clínico AURA2 y de la extensión de AURA (Tabla 25). Se utilizó la extensión del estudio AURA para complementar las muestras de cohorte AURA2 con el objetivo de aumentar la probabilidad de detectar mutaciones raras en plasma. No obstante, no se ha evaluado el rendimiento analítico de la prueba **cobas** EGFR para la detección de dichas mutaciones.

Tabla 25 Mutaciones detectadas en la extensión del estudio AURA y el estudio AURA2 que presentan reactividad cruzada con la prueba cobas EGFR

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|------|-----------------------|---------------|----------------------------|
| 19 | 2236_2256>ATC | E746_S752>I | 133190 |
| | 2237_2258>TATC | E746_P753>VS | No identificado |
| | 2239_2256>CAG | L747_S752>Q | No identificado |
| | 2239_2264>GCCAA | L747_A755>AN | 85891 |
| | 2240_2264>CGAGAGA | L747_A755>SRD | No identificado |

Especificidad – Microorganismos

La especificidad de la prueba **cobas** EGFR se evaluó mediante el análisis de *Staphylococcus epidermidis* con una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC), concentración que no presenta reacciones cruzadas ni interferencias con la prueba **cobas** EGFR cuando se añade a muestras de plasma conservadas en K2 EDTA de donantes sanos y que contienen secuencias mutadas y no mutadas del gen EGFR.

Interferencia

Plasma recogido en K2 EDTA

Se ha demostrado que los triglicéridos (37 mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹), 0,2 g/l de bilirrubina (sin conjugar o conjugada, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹) y la hemoglobina (1,5 g/l) no interfieren con la prueba **cobas** EGFR cuando la posible sustancia interferente se añade a muestras de plasma de donantes sanos conservadas en K2 EDTA y que contienen secuencias mutadas y no mutadas del gen EGFR. Se ha observado que una concentración de hemoglobina de 2,0 g/l en plasma interfiere con la prueba **cobas** EGFR. Una concentración de albúmina de ≥ 60 g/l (60 g/l, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹) puede interferir con la prueba **cobas** EGFR.

Los resultados del estudio demuestran que las sustancias EDTA, neupogen y TARCEVA® no interfieren con el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR cuando la posible sustancia interferente se añade a muestras de plasma de donantes sanos conservadas en K2 EDTA que contienen secuencias mutadas y no mutadas del gen EGFR.

Plasma recogido en Roche cfDNA

Se ha demostrado que los triglicéridos (37 mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹), 0,2 g/l de bilirrubina (sin conjugar o conjugada, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹), la hemoglobina (2,0 g/l) y la albúmina (60 g/l, la concentración más elevada recomendada por el CLSI²¹) no interfieren con la prueba **cobas** EGFR cuando la posible sustancia interferente se añade a muestras de plasma de donantes sanos recogidas en Roche cfDNA que contienen secuencias mutadas y no mutadas del gen EGFR.

07340761001-08ES

Linealidad

Plasma recogido en K2 EDTA

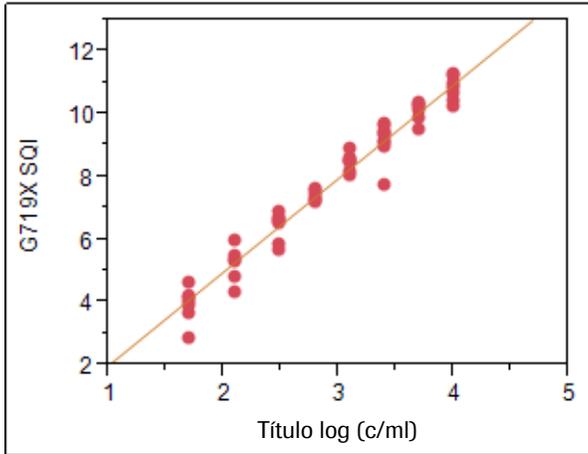
El estudio de linealidad de la prueba **cobas** EGFR se llevó a cabo con una serie de dilución formadas por un panel de al menos 8 miembros con el que se cubría el rango lineal de la mutación predominante para cada una de las clases de mutación del gen EGFR detectadas con la prueba. Los miembros del panel se prepararon diluyendo ADN de líneas celulares que contenían cada una de las mutaciones predominantes en plasma conservado en K2 EDTA de donantes sanos de EGFR no mutado. La evaluación se realizó de acuerdo con la directriz EP-06A del CLSI.²⁴ Se analizaron diez réplicas por miembro del panel para cada 2 lotes en concentraciones de hasta 1,0E+04 copias/ml (20 réplicas totales por nivel). Por encima de 1,0E+04 copias/ml, se analizó una réplica por lote.

Para cada una de las clases de mutación de la prueba **cobas** EGFR, se indica el intervalo lineal en la Tabla 26 y se muestran los gráficos correspondientes a un lote en las ilustraciones de la Ilustración 8 a la Ilustración 14.

Tabla 26 Intervalo lineal de la prueba cobas EGFR con plasma conservado en K2 EDTA

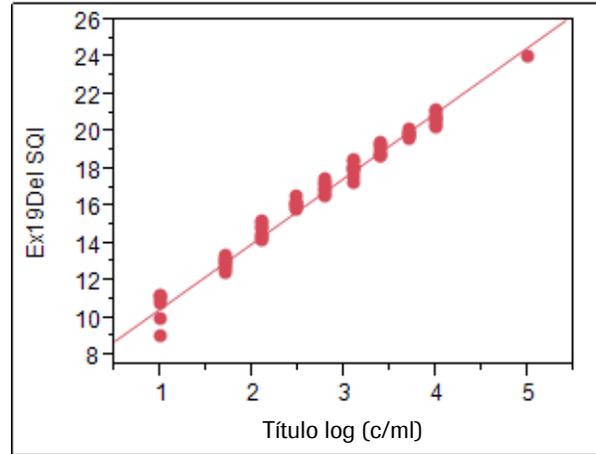
| Exón del EGFR | Mutación en EGFR | Secuencia de ácidos nucleicos analizada | Intervalo lineal (copias/ml) |
|---------------|-------------------------|---|------------------------------|
| 18 | G719A | 2156G>C | 50-1E+04 |
| 19 | Delección en el exón 19 | 2235_2249del15 | 10-1E+05 |
| 20 | S768I | 2303G>T | 10-1E+05 |
| 20 | T790M | 2369C>T | 50-1E+05 |
| 20 | Inserción en el exón 20 | 2307_2308ins9GCCAGCGTG | 10-1E+05 |
| 21 | L858R | 2573T>G | 10-1E+05 |
| 21 | L861Q | 2582T>A | 10-1E+05 |

Ilustración 8 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular G719A



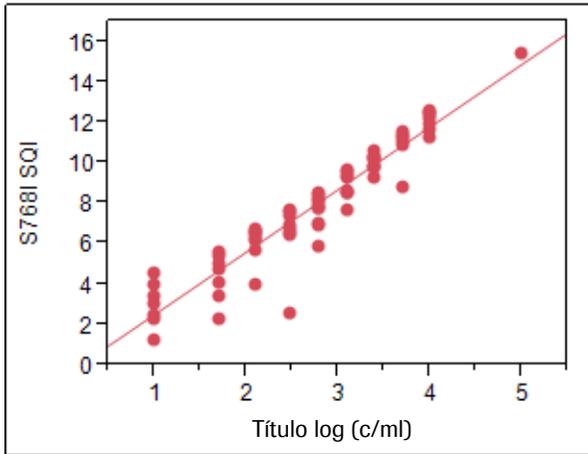
$SQI = -0,987 + 2,986 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,968$

Ilustración 9 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular Ex19Del



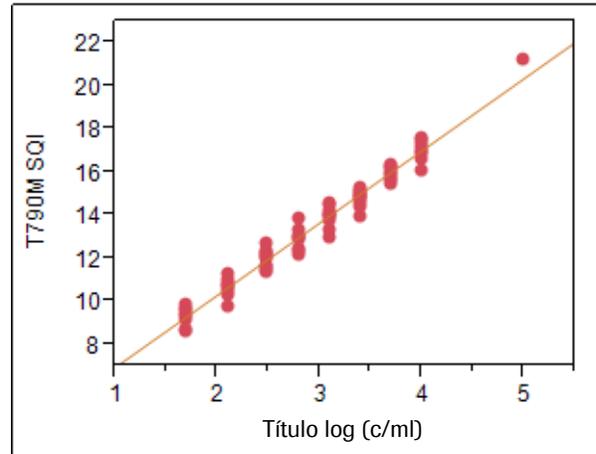
$SQI = 7,042 + 3,507 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,981$

Ilustración 10 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular S768I



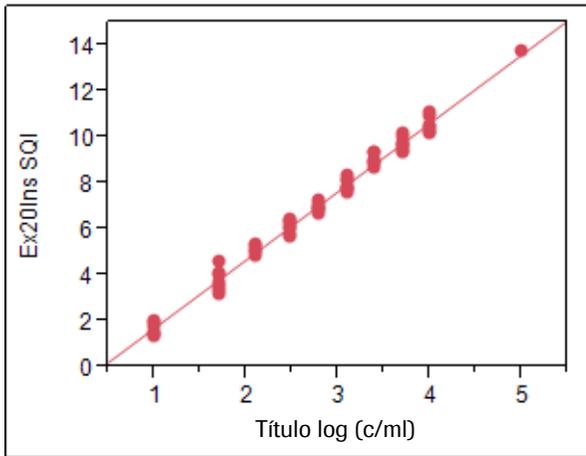
$SQI = -0,578 + 3,093 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,912$

Ilustración 11 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular T790M



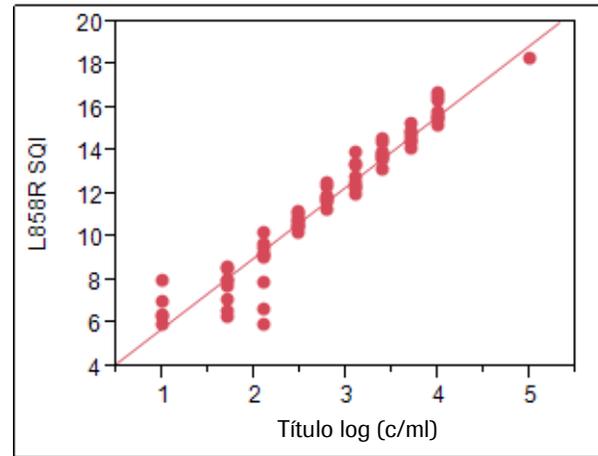
$SQI = 3,593 + 3,352 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,973$

Ilustración 12 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular Ex20Ins



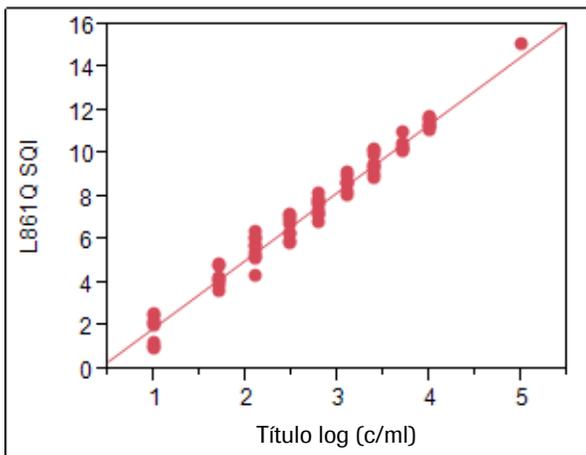
$SQI = -1,268 + 2,973 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,990$

Ilustración 13 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular L858R



$SQI = 2,543 + 3,283 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,933$

Ilustración 14 Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA:
ADN de línea celular L861Q



$SQI = -1,177 + 3,149 \times \text{Copias por ml log}$
 $R^2 = 0,980$

Plasma recogido en Roche cfDNA

El intervalo lineal con plasma recogido en Roche cfDNA se verificó mediante una serie de dilución de al menos 6 miembros del panel que cubren todo el intervalo lineal establecido para muestras de plasma recogido en K2 EDTA (tabla 26). Los miembros del panel se separaron diluyendo ADN de línea celular fragmentado con cada una de las mutaciones predominantes en plasma recogido en Roche cfDNA procedente de donantes sanos con EGFR no mutado. La evaluación se realizó según las directrices del EP06-A del CLSI.²⁴ Se analizaron cuatro réplicas por miembro del panel para 2 lotes en concentraciones de hasta 1,0E+04 copias/ml (8 réplicas totales por nivel). Por encima de 1,0E+04 copias/ml, se analizaron 2 réplicas por lote (4 réplicas en total por nivel).

Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba **cobas** EGFR se determinó mediante un panel de doce muestras formadas por diluciones de ADN de línea celular de EGFR mutado diluido en muestras de plasma de donantes sanos conservadas en K2 EDTA. Se codiluyó la mutación predominante de cada una de las clases según la prueba en once muestras y se valoró posteriormente con una concentración de $3 \times \text{LoD}$ respectivo de cada mutación (en copias/ml), $1,0\text{E}+03$ copias/ml y $5,0\text{E}+04$ copias/ml. Se analizó además una muestra no mutada. Dos usuarios analizaron por duplicado cada una de las doce muestras utilizando dos lotes de reactivo distintos y dos **cobas z 480** analyzers durante 4 días ($N = 32$ por muestra). La prueba **cobas** EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 99,2 % (381/384).

La Tabla 27 indica el SQI medio y el SD del SQI del estudio de repetibilidad. Las 32 réplicas del tipo de muestra no mutado generaron el resultado “No Mutation Detected” esperado.

Tabla 27 SQI medio y SD del SQI del estudio de repetibilidad

| Exón del EGFR | Mutación en EGFR | Secuencia de ácidos nucleicos analizada | Concentración (copias/ml) | SQI medio | SD del SQI (n = 32) |
|----------------|------------------|---|---------------------------|-----------|---------------------|
| 18 | G719A | 2156G>C | 3,00E+02 | 4,53 | 0,41 |
| | | | 1,00E+03 | 6,86 | 0,38 |
| | | | 5,00E+04 | 11,81 | 0,67 |
| 19 | Ex19Del | 2235_2249del15 | 7,50E+01 | 13,42 | 0,46 |
| | | | 1,00E+03 | 16,85 | 0,42 |
| | | | 5,00E+04 | 22,31 | 0,55 |
| 20 | S768I | 2303G>T | 6,00E+01 | 5,99 | 0,45 |
| | | | 1,00E+03 | 8,49 | 0,43 |
| | | | 5,00E+04 | 14,13 | 0,43 |
| 20 | T790M | 2369C>T | 7,50E+01 | 9,00 | 1,03 |
| | | | 1,00E+03 | 13,28 | 0,43 |
| | | | 5,00E+04 | 19,52 | 0,57 |
| 20 | Ex20Ins | 2307_2308ins9GCCAGCGTG | 2,40E+02 | 4,92 | 0,43 |
| | | | 1,00E+03 | 6,77 | 0,40 |
| | | | 5,00E+04 | 12,61 | 0,60 |
| 21 | L858R | 2573T>G | 1,20E+02 | 9,81 | 0,47 |
| | | | 1,00E+03 | 12,91 | 0,28 |
| | | | 5,00E+04 | 17,21 | 0,81 |
| 21 | L861Q | 2582T>A | 4,50E+01 | 3,58 | 0,73 |
| | | | 1,00E+03 | 7,91 | 0,45 |
| | | | 5,00E+04 | 10,06 | 0,60 |
| EGFR no mutado | | | 0 | NMD | NMD |

NMD = No Mutation Detected (Mutación no detectada)

Evaluación clínica del rendimiento

Reproducibilidad clínica con plasma recogido en K2 EDTA

Se realizó un estudio para valorar la reproducibilidad de la prueba cobas EGFR en 3 laboratorios de análisis (2 externos y uno interno, con 2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivo y durante 3 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de nueve miembros de muestras artificiales formadas por ADN de línea celular diluido en plasma de CPCNP. Se detectaron mutaciones como la mutación G719X en el exón 18, una mutación por delección del exón 19, dos mutaciones T790M en el exón 20 y una mutación por inserción en el exón 20, una mutación L858R en el exón 21 y una mutación L861Q en el exón 21 en cuatro muestras artificiales, tal como se resume en la Tabla 28. Cada una de las muestras artificiales se preparó con dos niveles: aproximadamente 100 copias/ml y 300 copias/ml. Estas muestras artificiales se integraron en ocho miembros distintos del panel junto con un control no mutado para obtener un panel de nueve miembros.

Tabla 28 Combinaciones de mutaciones en las muestras artificiales

| Combinación 1 de ADN de línea celular | Combinación 2 de ADN de línea celular | Combinación 3 de ADN de línea celular | Combinación 4 de ADN de línea celular |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Del. exón 19 | L858R | S768I | L861Q |
| T790M | T790M | G719A | Ins. exón 20 |

En total se realizaron 37 series, de las cuales 36 fueron válidas y una, no válida. De un total de 648 paneles (o 1.224 mutaciones) analizados, 646 paneles (o 1.220 mutaciones) obtuvieron resultados válidos. No se obtuvieron resultados “Mutation Detected” para ninguna de las 72 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100 %. La concordancia difiere según los miembros mutados: ocho obtuvieron una concordancia del 100 %, para cinco fue > 97 % y una de las mutaciones (G719X) presentó una concordancia inferior de aproximadamente el 90 %. En la Tabla 29 se muestran los resultados de concordancia general para cada tipo de mutación. El coeficiente de variación (CV) fue ≤ 12,8 % para todos los miembros mutados del panel. En el caso de los controles interno y de mutación, el CV general fue ≤ 1,5 %. El CV entre lotes fue ≤ 0,89 % y ≤ 1,47 % intralote.

Tabla 29 Estimaciones generales de concordancia por miembro de mutación en el estudio de reproducibilidad

| Miembro de mutación | Número de pruebas válidas | Concordancia N | % de concordancia (IC del 95 %) ^a |
|---|---------------------------|----------------|--|
| No mutado – n/d | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 18 G719A – 100 copias/ml | 72 | 65 | 90,3 (81,0, 96,0) ^b |
| Deleción en el exón 19 (2235_2249del15) – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 (2307_2308ins9) – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 S768I – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 T790M – 100 copias/ml | 143 | 139 | 97,2 (93,0, 99,2) |
| Exón 21 L858R – 100 copias/ml | 71 | 70 | 98,6 (92,4, 100,0) |
| Exón 21 L861Q – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 18 G719A – 300 copias/ml | 71 | 70 | 98,6 (92,4, 100,0) |
| Deleción en el exón 19 (2235_2249del15) – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 (2307_2308ins9) – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 S768I – 300 copias/ml | 71 | 71 | 100 (94,9, 100,0) |
| Exón 20 T790M – 300 copias/ml | 144 | 142 | 98,6 (95,1, 99,8) |
| Exón 21 L858R – 300 copias/ml | 72 | 71 | 98,6 (92,5, 100,0) |
| Exón 21 L861Q – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |

^a IC del 95 % = Intervalo de confianza binomial exacto del 95 %.

^b La concordancia inferior de esta muestra se debe principalmente a la ausencia repetida de identificaciones (n = 6/24 réplicas combinadas) principalmente en uno de los tres laboratorios.

Nota: se considera que existe concordancia de resultados cuando un miembro mutado del panel genera un resultado “Mutation Detected” válido o cuando un miembro no mutado del panel genera un resultado “No Mutation Detected” válido.

Nota: las muestras utilizadas en el estudio constan de ADN de línea celular fragmentado mecánicamente a un tamaño medio de 220 bp y con un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 12.000 copias/ml.

Reproducibilidad clínica con plasma recogido en Roche cfDNA

Se realizó un estudio para valorar la reproducibilidad de la prueba **cobas** EGFR en 3 laboratorios de análisis (2 externos y 1 interno, con 2 usuarios por laboratorio), con un lote de reactivo y durante 3 días de análisis no consecutivos utilizando tres paneles de nueve miembros de muestras artificiales formadas por ADN de línea celular diluido en tres pools individuales de plasma de donantes sanos. Las muestras de cada pool se recogieron con un único lote de tubos Roche cfDNA. Se analizaron dos de los paneles de plasma en cada laboratorio. Se detectaron mutaciones como la mutación G719X en el exón 18, una mutación por deleción del exón 19, una mutación T790M en el exón 20 y una mutación por inserción en el exón 20, una mutación L858R en el exón 21 y una mutación L861Q en el exón 21 en cuatro muestras artificiales, tal como se resume en la Tabla 30. Cada una de las muestras artificiales se preparó con dos niveles: aproximadamente 100 copias/ml y 300 copias/ml. Estas muestras artificiales se integraron en ocho miembros distintos del panel junto con un control no mutado para obtener un panel de nueve miembros.

Tabla 30 Combinaciones de mutaciones en las muestras artificiales

| Combinación 1 de ADN de línea celular | Combinación 2 de ADN de línea celular | Combinación 3 de ADN de línea celular | Combinación 4 de ADN de línea celular |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Del. exón 19 | S768I | T790M | L858R |
| Ins. exón 20 | G719A | L861Q | N/A |

En total, se realizaron 36 series, siendo todas ellas válidas. De un total de 648 paneles analizados, 646 paneles (o 1.220 mutaciones) obtuvieron resultados válidos. Se obtuvo un resultado “Mutation Detected” en 72 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 98,6 %. La concordancia difiere según los miembros mutados: trece obtuvieron una concordancia del 100 % y uno fue de > 98 %. En la Tabla 31 se muestran los resultados de concordancia general para cada tipo de mutación. El coeficiente de variación (CV) fue $\leq 13,7$ % para todos los miembros mutados del panel. En el caso de los controles interno y de mutación, el CV general fue $\leq 1,3$ %.

Tabla 31 Estimaciones generales de concordancia por miembro de mutación en el estudio de reproducibilidad

| Miembro de mutación | Número de pruebas válidas | Concordancia N | % de concordancia (IC del 95 %) ^a |
|---|---------------------------|----------------|--|
| No mutado – n/d | 72 | 71 | 98,6 (92,5, 100,0) |
| Exón 18 G719A – 100 copias/ml | 72 | 71 | 98,6 (92,5, 100,0) |
| Deleción en el exón 19 (2235_2249del15) – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 (2307_2308ins9) – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 S768I – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 T790M – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 21 L858R – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 21 L861Q – 100 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 18 G719A – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Deleción en el exón 19 (2235_2249del15) – 300 copias/ml | 71 | 71 | 100 (94,9, 100,0) |
| Inserción en el exón 20 (2307_2308ins9) – 300 copias/ml | 71 | 71 | 100 (94,9, 100,0) |
| Exón 20 S768I – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 20 T790M – 300 copias/ml | 71 | 71 | 100 (94,9, 100,0) |
| Exón 21 L858R – 300 copias/ml | 72 | 72 | 100 (95,0, 100,0) |
| Exón 21 L861Q – 300 copias/ml | 71 | 71 | 100 (94,9, 100,0) |

^a IC del 95 % = Intervalo de confianza binomial exacto del 95 %.

Nota: se considera que existe concordancia de resultados cuando un miembro mutado del panel genera un resultado “Mutation Detected” válido o cuando un miembro no mutado del panel genera un resultado “No Mutation Detected” válido.

Límite de detección (LoD) con muestras de plasma de CPCNP

Se realizó un estudio para confirmar el LoD con muestras de plasma de CPCNP recogidas en K2 EDTA para tres deleciones en el exón 19, una mutación L858R y una mutación T790M con la prueba cobas EGFR en tres laboratorios (dos externos y uno interno, con dos usuarios por centro), tres lotes de reactivo y durante dos días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 11 miembros de muestras de plasma de CPCNP (cinco mutaciones en cada uno con dos niveles: $1 \times \text{LoD}$ y $2 \times \text{LoD}$; más no mutado). Se realizó un total de 12 series (dos réplicas por serie) y se obtuvieron resultados válidos para todas ellas. Se realizó un total de 264 pruebas con los 11 miembros del panel, de las cuales 262 (99,2 %) fueron válidas. No se obtuvieron resultados “Mutation Detected” para ninguna de las 23 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100 %. El porcentaje de concordancia para exón 20 T790M – $1 \times \text{LoD}$ es del 95,8 %, mientras que para los demás miembros mutados del panel es del 100 %. Las estimaciones de concordancia por miembro del panel se resumen en la Tabla 32. El coeficiente de variación (CV) fue $< 7,0$ % para todos los miembros mutados del panel.

Tabla 32 Estimaciones de concordancia por miembro del panel

| Miembro del panel | Número de pruebas válidas | Concordancia N | % de concordancia (IC del 95 %) ^a |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------|--|
| No mutado - n/d | 23 | 23 | 100 (85,2, 100,0) |
| Delección 1 del exón 19 - 1 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Delección 1 del exón 19 - 2 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Delección 2 del exón 19 - 1 × LoD | 23 | 23 | 100 (85,2, 100,0) |
| Delección 2 del exón 19 - 2 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Delección 3 del exón 19 - 1 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Delección 3 del exón 19 - 2 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Exón 20 T790M - 1 × LoD | 24 | 23 | 95,8 (78,9, 99,9) |
| Exón 20 T790M - 2 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Exón 21 L858R - 1 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |
| Exón 21 L858R - 2 × LoD | 24 | 24 | 100 (85,8, 100,0) |

^a IC del 95 % = Intervalo de confianza binomial exacto del 95 %.

Nota: se considera que un resultado es concordante cuando una prueba válida de un miembro mutado del panel genera un resultado “Mutation Detected” o cuando una prueba válida de un miembro no mutado del panel genera un resultado “No Mutation Detected”.

Nota: las muestras clínicas utilizadas en el estudio tenían un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 24.000 copias/ml.

Correlación de plasma recogido en Roche cfDNA con plasma recogido en K2 EDTA

Se comparó el rendimiento de la prueba **cobas** EGFR con plasma recogido en K2 EDTA frente a plasma recogido en Roche cfDNA mediante el análisis de un panel de muestras que incluía extracciones paralelas de 34 pacientes de CPCNP con EGFR no mutado, 17 pacientes de CPCNP positivos a la mutación de EGFR y 20 donantes sanos. Las extracciones de donantes sanos se utilizaron para crear muestras artificiales formadas por ADN de línea celular fragmentado con las mutaciones predominantes detectadas por la prueba **cobas** EGFR añadido a la extracción de sangre total en tubos K2 EDTA y Roche cfDNA. El nivel agregado de ADN de línea celular fragmentada a las muestras artificiales fue de aproximadamente 1,5 × LoD para cada mutación, tal como se determinó para el plasma recogido en K2 EDTA (Tabla 24). El estado de mutación se confirmó para cada paciente de CPCNP mediante un método NGS. Todas las muestras se analizaron con un lote de reactivos de la prueba **cobas** EGFR. Se obtuvieron resultados válidos para todas las muestras y los resultados de la comparación se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33 Análisis de concordancia entre plasma recogido en K2 EDTA y plasma procedente de un tubo Roche cfDNA

| | | Tubo K2 EDTA | | Total |
|--------------------------|-------|--------------|-----------|-----------|
| | | MD | NMD | |
| Tubo Roche Cell-Free DNA | MD | 37 | 0 | 37 |
| | NMD | 0 | 34 | 34 |
| | Total | 37 | 34 | 71 |

| | |
|---|---------------------|
| Concordancia de positividad (%): IC del 95 % | 100 % 90,5-100 % |
| Concordancia de negatividad (%): IC del 95 % | 100 % 89,7-100 % |
| Concordancia general (%): IC del 95 % | 100 % 94,5-100 % |

Donde: MD = Mutation Detected (Mutación detectada) y NMD = No Mutation Detected (Ninguna mutación detectada)

La concordancia entre los pares de muestras de plasma recogido en K2 EDTA y plasma procedente de Roche Cell-Free DNA Collection Tubes fue del 100 %. No se observaron resultados discordantes.

En las muestras de plasma del estudio, la prueba cobas EGFR detectó las mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR que se indican en la Tabla 34. Salvo que se indique lo contrario, las mutaciones se observaron en las muestras de CPCNP.

Tabla 34 Mutaciones observadas en la correlación de plasma recogido en Roche cfDNA con plasma recogido en K2 EDTA

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|------|---|--------------------|----------------------------|
| 18 | 2156G>C* | G719A | 6239 |
| | 2155G>A [§] | G719S | 6252 |
| 19 | 2235_2249del15 ⁺ | E746_A750delELREA | 6223 |
| | 2236_2250del15 [§] | E746_A750delELREA | 6225 |
| | 2219_2236dup TTCCCGTCGCTATCAAGG [§] | K745_E746insVPVAIK | 6963938 |
| | 2237_2248del12 [§] | E746_E749delELRE | No identificado |
| | 2237_2251del15 [§] | E746_T751>A | 12678 |
| | 2239_2240TT>CC [§] | L747P | 24267 |
| | 2251A>C [§] | T751P | No identificado |
| 20 | 2369C>T ⁺ | T790M | 6240 |
| | 2303G>T ⁺ | S768I | 6241 |
| | 2307_2308insGCCAGCGTG* | V769_D770insASV | 12376 |
| 21 | 2573T>G ⁺ | L858R | 6224 |
| | 2582T>A* | L861Q | 6213 |

* Observada únicamente en muestra artificial

⁺ Observada en muestra artificial y muestra de CPCNP

[§] Observada únicamente en muestra de CPCNP

Correlación con el método de referencia con muestras de plasma de fase III de la cohorte ASPIRATION

La precisión analítica de la prueba cobas EGFR para la detección de las mutaciones por delección del exón 19 y L858R se determinó mediante la comparación con una plataforma de secuenciación de próxima generación (NGS) validada y muestras de plasma recogido en K2 EDTA de pacientes con CPCNP avanzado de uno o más de los siguientes estudios (cohorte ASPIRATION): estudios clínicos Genentech G027821 (MetMab) y G027761 (MetLung) junto con el estudio clínico Roche ML25637 (ASPIRATION).

En el análisis de concordancia de las mutaciones por delección del exón 19 y L858R del gen EGFR se incluyeron ciento veintiocho muestras de plasma con un volumen de 2 ml y resultados válidos tanto con la prueba cobas EGFR en plasma como con el método NGS con muestras de plasma. Un total de 32 muestras generaron resultados MD, mientras que 95 generaron resultados NMD con el método NGS. El PCP entre la prueba cobas EGFR en plasma y el método NGS en plasma fue del 87,5 % (IC del 95 %: 71,9 %, 95,0 %); el PCN entre la prueba cobas EGFR y el método NGS fue del 96,8 % (IC del 95 %: 91,1 %, 98,9 %), tal como se muestra en la Tabla 35.

Tabla 35 Comparación entre la prueba cobas EGFR en plasma y el método NGS para la detección de mutaciones por delección en el exón 19 y la mutación L858R de EGFR

| Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|---|--------------------------------|----------------|
| Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 87,5 % (28/32) | 71,9 %, 95,0 % |
| Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 96,8 % (92/95) | 91,1 %, 98,9 % |

Correlación entre muestras de plasma y tejido según la prueba cobas EGFR para la detección de las mutaciones de delección del exón 19 y L858R mediante muestras de fase III de ENSURE

El estudio ENSURE (YO25121) es un estudio abierto, multicéntrico y aleatorizado de fase III que permite evaluar la eficacia y seguridad de TARCEVA® (erlotinib) con relación al gemcitabina/cisplatino como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) de fase IIIB/IV con mutaciones por delección del exón 19 o L858R en el dominio de la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de sus tumores. Se cribó un total de 647 pacientes, 601 de los cuales obtuvieron resultados de EGFR en tejido válido para delecciones en el exón 19 o la mutación L858R mediante la prueba cobas EGFR. En el estudio se aleatorizaron 217 pacientes.

Quinientos diecisiete pacientes (86,0 %, 517/601) tenían también muestras de plasma recogido en K2 EDTA y muestras de tejidos equivalentes y 441 pacientes tenían un volumen de muestra de plasma de ≥ 2,0 ml, es decir, el volumen de muestra con el que se ha validado la prueba cobas EGFR en plasma.

La correlación de muestras de plasma y de tejido con la prueba cobas EGFR para la detección de mutaciones por delección del exón 19 y la mutación L858R se evaluó tanto por separado como de forma global. En el análisis de concordancia se incluyó un total de 431 muestras con resultados válidos tanto de muestras de tejido como de muestras de plasma con la prueba cobas EGFR. El porcentaje de concordancia de positivos (PCP) entre la muestra de plasma y de tejido fue del 76,7 % (IC del 95 %: entre 70,5 % y 81,9 %), el porcentaje de concordancia de negativos (PCN) fue del 98,2 % (IC del 95 %: entre 95,4 % y 99,3 %) para la detección agregada de delecciones en el exón 19 y mutaciones L858R, tal como se muestra en la Tabla 36. Los valores PCP, PCN y PCG para la detección de delecciones en el exón 19 y mutaciones L858R por separado también se indican en la Tabla 36.

Tabla 36 Concordancia entre muestras de plasma y muestras de tejido con la prueba cobas EGFR para la detección de delecciones en el exón 19 y mutaciones L858R

| Mutación | Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|-------------------------|---|--------------------------------|----------------|
| Agregado | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 76,7 % (161/210) | 70,5 %, 81,9 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 98,2 % (217/221) | 95,4 %, 99,3 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 87,7 % (378/431) | 84,2 %, 90,5 % |
| Delección en el exón 19 | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 80,8 % (97/120) | 72,9 %, 86,9 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 98,7 % (307/311) | 96,7 %, 99,5 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 93,7 % (404/431) | 91,0 %, 95,7 % |
| L858R | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 67,8 % (61/90) | 57,6 %, 76,5 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 99,1 % (338/341) | 97,4 %, 99,7 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 92,6 % (399/431) | 89,7 %, 94,7 % |

Nota: valores PCP y PCN calculados con el tejido como referencia.

El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) para la detección agregada de deleciones en el exón 19 y mutaciones L858R también se calcularon mediante el método bootstrap a partir de la prevalencia de tejidos de diferentes poblaciones (Tabla 37). Como cabía esperar, el VPP aumenta mientras que el VPN disminuye conforme aumenta la prevalencia de la mutación en EGFR. En el caso de la población caucásica, para la que se estima una prevalencia de la mutación EGFR en tejido de entre un 10 y un 15 %, el VPP oscila entre el 82,8 % y el 88,6 %, mientras que el VPN oscila entre un 96,0 % y un 97,4 %. El VPP está comprendido entre un 94,8 % y un 97,8 % mientras que el VPN, entre un 80,8 % y un 90,9 % según datos de prevalencia en la población asiática y teniendo en cuenta una prevalencia de la mutación del gen EGFR en el tejido del 30-50 %.

Tabla 37 Valores predictivos estimados de la prueba cobas EGFR en tejido y de la prueba cobas EGFR en plasma (pacientes con volúmenes de muestra de plasma ≥ 2,0 ml) a partir de las diferentes prevalencias de mutación de EGFR en tejido

| Prevalencia de EGFR supuesta según las muestras de tejido | Valor predictivo positivo (VPP) | Valor predictivo negativo (VPN) |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| 10 % | 82,8 % (71,3 %, 93,7 %) | 97,4 % (96,2 %, 98,7 %) |
| 15 % | 88,6 % (79,7 %, 96,9 %) | 96,0 % (94,3 %, 97,6 %) |
| 20 % | 91,6 % (85,0 %, 97,8 %) | 94,4 % (92,3 %, 96,3 %) |
| 30 % | 94,8 % (90,0 %, 98,6 %) | 90,9 % (88,4 %, 93,4 %) |
| 40 % | 96,8 % (93,0 %, 99,4 %) | 86,4 % (83,3 %, 89,4 %) |
| 50 % | 97,8 % (95,0 %, 100,0 %) | 80,8 % (77,4 %, 84,8 %) |

Nota: los IC del 95 % se calcularon según el método bootstrap.

Nota: el resultado de 79 muestras con un volumen < 2,0 ml se consideró no válido para el análisis.

Nota: valores VPP y VPN calculados tomando el plasma como referencia.

Correlación con el método de referencia con muestras de fase II del estudio AURA2

El rendimiento clínico de la prueba cobas EGFR se determinó mediante comparación con una plataforma de secuenciación de próxima generación (NGS) validada y muestras de plasma recogido en K2 EDTA de pacientes con CPCNP avanzado sometidos a cribado en la fase II del estudio AURA2 con TAGRISSO®.²³

De los 383 pacientes aptos, 344 tenían una muestra de plasma disponible que se analizó con la prueba cobas EGFR. Se obtuvieron 342 resultados válidos y dos no válidos. Del total de 344 muestras de plasma analizadas con la prueba cobas EGFR, 322 (93,6 %) también se analizaron con un método NGS y resultó que 22 no tenían un volumen de plasma suficiente para el análisis con NGS.

Se evaluó la comparación de la precisión analítica entre la prueba cobas EGFR y el método de referencia, NGS, para la detección de la mutación T790M en muestras de plasma. En el análisis de concordancia se incluyó un total de 320 muestras con resultados válidos tanto con la prueba cobas EGFR como con el método NGS. El porcentaje de concordancia de positivos (PCP) y el porcentaje de concordancia de negativos (PCN) entre la prueba cobas EGFR y NGS fue del 91,5 % (IC del 95 %: 85,7 % a 95,1 %) y del 91,1 % (IC del 95 %: 86,0 % a 94,4 %) respectivamente para la detección de la mutación T790M, tal y como se muestra en la Tabla 38.

Tabla 38 Comparación entre la prueba cobas EGFR en plasma y el método NGS para la detección de la mutación T790M en EGFR

| Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|---|--------------------------------|----------------|
| Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 91,5 % (129/141) | 85,7 %, 95,1 % |
| Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 91,1 % (163/179) | 86,0 %, 94,4 % |

En las muestras de plasma recogido en K2 EDTA del estudio AURA2, la prueba cobas EGFR detectó las mutaciones de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR que se indican en la Tabla 39.

Tabla 39 Mutaciones detectadas por la prueba cobas EGFR en la cohorte AURA2

| Exón | Secuencia de mutación | Cambio AA | ID de COSMIC ¹⁴ |
|----------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|
| 18 | 2156G>C | G719A | 6239 |
| | 2155G>A | G719S | 6252 |
| | 2155G>T | G719C | 6253 |
| 19 | 2235_2249del15 | E746_A750delELREA | 6223 |
| | 2236_2250del15 | E746_A750delELREA | 6225 |
| | 2236_2256>ATC | E746_S752>I | 133190 |
| | 2237_2251del15 | E746_T751>A | 12678 |
| | 2237_2255>T | E746_S752>V | 12384 |
| | 2237_2258>TATC | E746_P753>VS | No identificado |
| | 2238_2248>GC | L747_A750>P | 12422 |
| | 2239_2247delTTAAGAGAA | L747_E749delLRE | 6218 |
| | 2239_2248TTAAGAGAAG>C | L747_A750>P | 12382 |
| | 2239_2251>C | L747_T751>P | 12383 |
| | 2239_2256>CAG | L747_S752>Q | No identificado |
| | 2239_2256del18 | L747_S752delLREATS | 6255 |
| | 2239_2258>CA | L747_P753>Q | 12387 |
| | 2239_2264>GCCAA | L747_A755>AN | 85891 |
| | 2240_2251del12 | L747_T751>S | 6210 |
| | 2240_2254del15 | L747_T751delLREAT | 12369 |
| | 2240_2257del18 | L747_P753>S | 12370 |
| | 2240_2264>CGAGAGA | L747_A755>SRD | No identificado |
| 2253_2276del24 | S752_I759delSPKANKEI | 13556 | |
| 20 | 2369C>T | T790M | 6240 |
| | 2303G>T | S768I | 6241 |
| 21 | 2573T>G | L858R | 6224 |
| | 2573_2574TG>GT | L858R | 12429 |
| | 2582T>A | L861Q | 6213 |

Correlación entre muestras de plasma y de tejido para la detección de T790M con muestras de fase II del estudio AURA2

El ensayo clínico AURA2²³ es un estudio de fase II abierto, multicéntrico y de un único grupo cuya finalidad es valorar la seguridad y la eficacia de TAGRISSO® (osimertinib) como tratamiento de segunda o ≥ tercera línea para pacientes con CPCNP avanzado cuya enfermedad haya empeorado después del tratamiento con un agente TKI aprobado para el gen EGFR y que hayan obtenido un resultado positivo para T790M según la prueba cobas EGFR. Tras un cribado de 472 pacientes, se analizaron las muestras de tejido de 383 pacientes, de los cuales 371 obtuvieron un resultado válido para EGFR en tejido con la mutación T790M según la prueba cobas EGFR. Un total de 233 pacientes resultaron positivos para T790M y se aleatorizaron 210 pacientes en el estudio.

De los 383 pacientes aptos, 344 tenían muestras de plasma recogido en K2 EDTA. En el análisis se incluyó un total de 334 muestras con resultados válidos tanto para muestras de tejido como de plasma con la prueba **cobas** EGFR. El porcentaje de concordancia de positivos (PCP) y el porcentaje de concordancia de negativos (PCN) entre las muestras de plasma y de tejido fue del 58,7 % (IC del 95 %: 52,2 % a 65,0 %) y del 80,2 % (IC del 95 %: 71,8 % a 86,5 %) respectivamente para la detección de la mutación T790M. El valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron del 85,6 % (IC del 95 %: 79,2 %, 90,3 %) y del 49,2 % (IC del 95 %: 42,0 %, 56,4 %) respectivamente para la detección de la mutación T790M, tal como se muestra en la Tabla 40.

El VPP que se indica en la Tabla 40 se vio afectado por las 22 muestras que resultaron negativas para T790M según la prueba **cobas** EGFR en tejido y positivas para T790M según la prueba **cobas** EGFR en plasma. Dieciocho muestras se confirmaron como positivas para T790M mediante NGS en plasma y una muestra carecía de volumen suficiente para realizar el análisis mediante NGS. Solamente tres muestras resultaron negativas para T790M según NGS.

Tabla 40 Concordancia entre muestras de plasma y muestras de tejido con la prueba cobas EGFR para la detección de la mutación T790M

| Mutación | Medida de concordancia | Porcentaje de concordancia (N) | IC del 95 % |
|----------|---|--------------------------------|----------------|
| T790M | Porcentaje de concordancia de positivos (PCP) | 58,7 % (131/223) | 52,2 %, 65,0 % |
| | Porcentaje de concordancia de negativos (PCN) | 80,2 % (89/111) | 71,8 %, 86,5 % |
| | Porcentaje de concordancia global (PCG) | 65,9 % (220/334) | 60,6 %, 70,8 % |
| | Valor predictivo positivo (VPP) | 85,6 % (131/153) | 79,2 %, 90,3 % |
| | Valor predictivo negativo (VPN) | 49,2 % (89/181) | 42,0 %, 56,4 % |

Nota: valores PCP y PCN calculados con el tejido como referencia.

Nota: valores VPP y VPN calculados tomando el plasma como referencia.

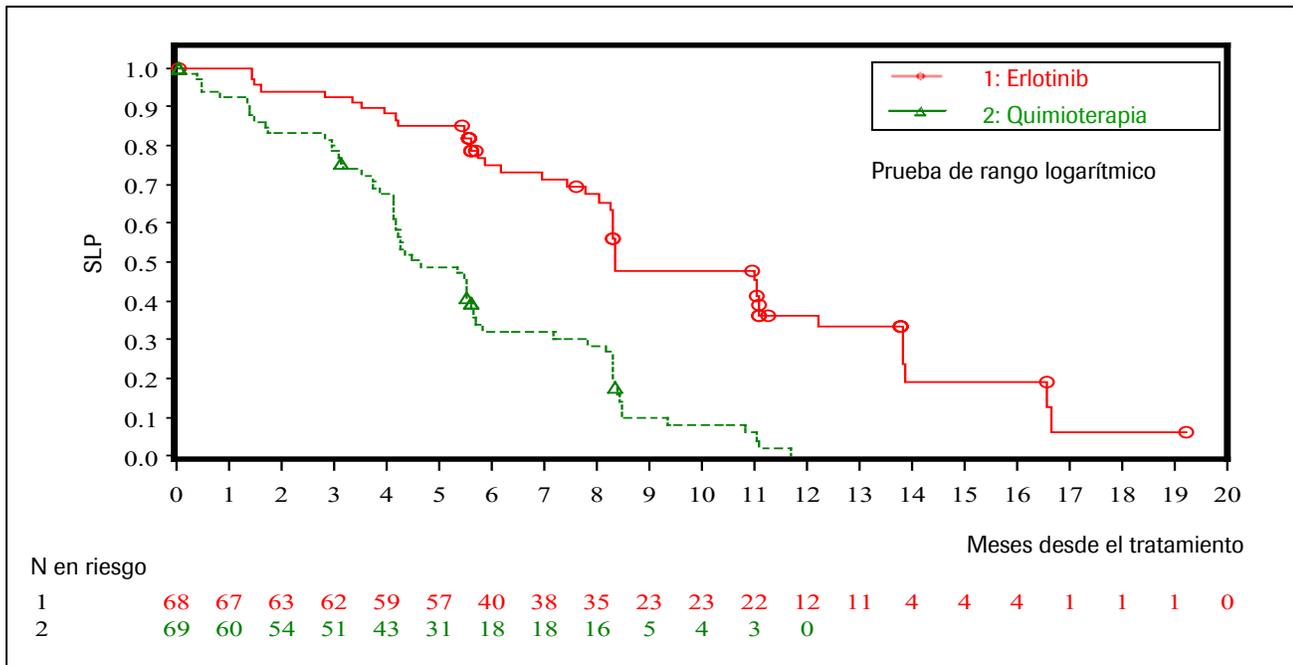
La concordancia entre muestras de plasma y de tejido para la detección de la mutación de resistencia T790M es inferior que para las mutaciones activadoras. El PCP puede verse afectado por la heterogeneidad del tejido: a diferencia de las mutaciones activadoras L858R y las deleciones en el exón 19, la mutación T790M puede estar presente en un pequeño porcentaje de células tumorales ya que suele ser una mutación adquirida; por lo tanto, el cfADN de T790M podría estar presente solamente en una concentración muy reducida en plasma y por debajo del nivel de detección. El PCN también puede verse afectado por la heterogeneidad del tumor: dado que es posible que la mutación T790M no esté presente en todas las células tumorales, puede realizarse una biopsia de tejido de un tumor en el que no esté presente la mutación T790M a pesar de que otros puntos tumorales sean positivos para T790M.⁷

Datos de los resultados clínicos

Estudio ENSURE

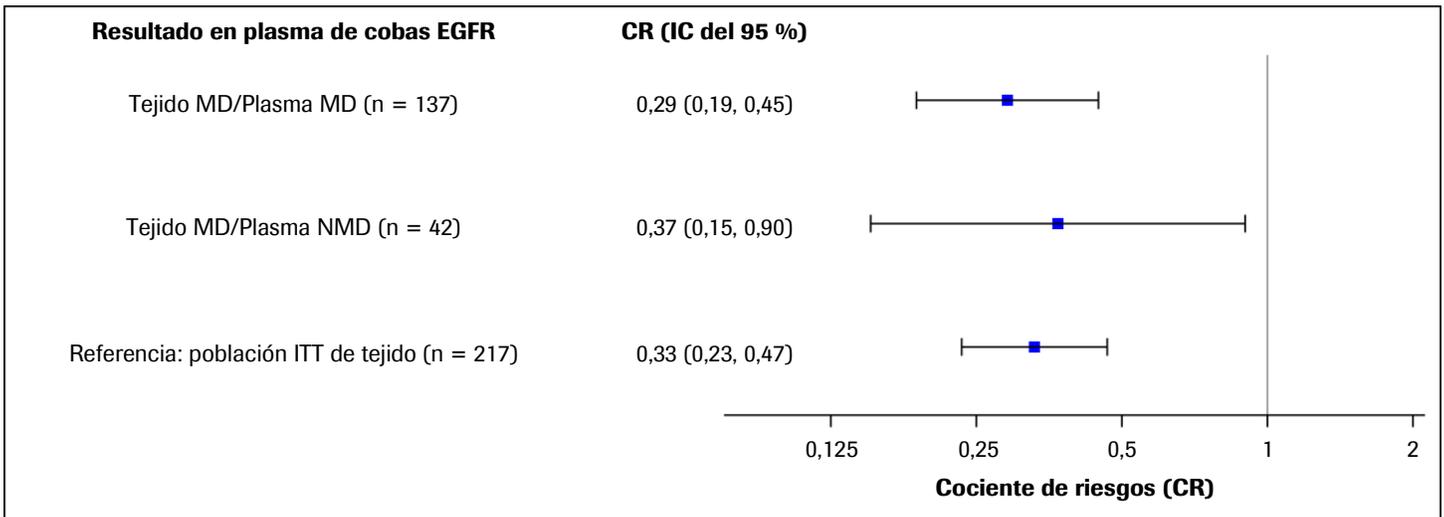
En el estudio ENSURE se incluyeron 217 pacientes (es decir, pacientes con una deleción en el exón 19 o la mutación L858R detectadas en una muestra de tejido con la prueba **cobas** EGFR v1), 214 de los cuales (98,6 %) disponían de una muestra de plasma recogido en K2 EDTA y 180 de los cuales tenían un volumen de muestra de plasma de 2,0 ml. De las 180 muestras de plasma con un volumen de 2 ml analizadas con la prueba **cobas** EGFR, 137 generaron un resultado "Mutation Detected" para deleciones en el exón 19 o la mutación L858R (68 pacientes del grupo erlotinib, 69 pacientes del grupo de quimioterapia), 42 generaron un resultado "No Mutation Detected" (22 pacientes del grupo de TARCEVA® y 20 pacientes del grupo de quimioterapia) y una única muestra generó un resultado no válido. La Ilustración 15 muestra las curvas de Kaplan-Meier para la valoración de la SLP por parte del investigador para pacientes con una deleción del exón 19 o una mutación L858R en una muestra de plasma. Los pacientes del grupo de TARCEVA® presentaron una SLP superior en relación con los pacientes del grupo de quimioterapia y existe una separación considerable entre ambas curvas durante el periodo de observación (valor $p < 0,001$), lo que muestra el importante beneficio de la terapia con TARCEVA® en pacientes con una mutación activadora en el gen EGFR detectable en plasma.

Ilustración 15 Gráfico de Kaplan-Meier para la SLP por tratamiento para pacientes con una mutación detectada con la prueba cobas EGFR tanto en plasma como en tejido (valoración del investigador) (con muestras de plasma de 2 ml)



Se observó un beneficio constante de la SLP en todos los pacientes con resultados positivos para la mutación EGFR en tejido con volúmenes de muestra de plasma de 2,0 ml, independientemente de si habían obtenido un resultado positivo o negativo para la mutación en plasma. El beneficio resultó similar al beneficio SLP observado en la población general del estudio ENSURE ITT (CR = 0,33; IC del 95 %: 0,23, 0,47) como se muestra en la siguiente Ilustración 16.

Ilustración 16 Diagrama de bosque para CR de SLP según la valoración del investigador (con muestras de plasma de 2 ml)



Nota: MD = resultado "Mutation Detected" (deleción del exón 19 o mutación L858R); NMD = resultado "No Mutation Detected" (deleción del exón 19 y mutación L858R)

Estudio AURA2

La principal variable de valoración de eficacia fue la tasa de respuesta objetiva (TRO) según RECIST 1.1 evaluada por el BICR con el grupo de análisis evaluable de respuesta. La TRO se definió como el número (%) de pacientes con un mínimo de una visita y un resultado de respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP) confirmada como mínimo cuatro semanas más tarde (es decir, una tasa óptima [TOO] de RC o RP).

En la población de tejido del grupo ERAS (grupo de análisis evaluable de respuesta) (pacientes positivos para T790M con la prueba **cobas** EGFR en tejido que han recibido como mínimo una dosis de TAGRISSO® y tienen una enfermedad cuantificable según la referencia del BICR), 111 pacientes resultaron positivos para T790M en plasma recogido en K2 EDTA mediante la prueba **cobas** EGFR (es decir, positivos para T790M tanto en muestras de tejido como de plasma). La TRO de este subgrupo fue del 64,9 % (72/111, IC del 95 %: 52,1 %, 70,4 %), una tasa muy similar a la TRO del 64,1 % observada en la población de tejido ERAS.

En la población de tejido del grupo GCA (grupo completo de análisis) (pacientes positivos para T790M con la prueba **cobas** EGFR en tejido y que han recibido como mínimo una dosis de TAGRISSO®), 117 pacientes resultaron positivos para T790M en plasma con la prueba **cobas** EGFR. La TRO de los pacientes con un resultado positivo para T790M tanto con muestras de plasma como de tejido fue del 61,5 % (72/117, IC del 95 %: 55,2 %, 73,7 %), muy similar también a la TRO del 61 % observada en la población de tejido del grupo GAC. Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 41. La participación en el estudio AURA2 dependía de la obtención de resultados positivos para la muestra de tejido, por lo que no están disponibles los datos de los resultados de este estudio para pacientes (positivos para T790M en plasma y negativos para T790M en tejido).

Tabla 41 Tasa de respuesta objetiva según los resultados de plasma de los pacientes participantes (positivos para T790M en tejido) en el estudio AURA2

| Población (positivos para T790M por muestra de tejido) | Resultados de la prueba cobas EGFR en muestras de plasma | N | Número de pacientes con respuesta (TRO) ^a n (%) | TRO (IC del 95 %) |
|--|---|-----|--|-------------------|
| Grupo completo de análisis de tejido (tejido GCA) | T790M+ (plasma GCA) | 117 | 72 (61,5 %) | (55,2 %, 73,7 %) |
| | T790M- | 89 | 53 (59,6 %) | (51,3 %, 73,0 %) |
| | General (tejido GCA) | 210 | 128 (61,0 %) | (57,0 %, 70,8 %) |
| Grupo de análisis evaluable de respuesta de tejido (tejido ERAS) | T790M+ (plasma ERAS) | 111 | 72 (64,9 %) | (52,1 %, 70,4 %) |
| | T790M- | 83 | 52 (62,7 %) | (48,6 %, 69,8 %) |
| | General (tejido ERAS) | 198 | 127 (64,1 %) | (54,0 %, 67,6 %) |

^a Las respuestas incluyen solamente respuestas confirmadas.

FLAURA

I. Ensayo de fase III para TAGRISSO® como tratamiento de primera línea

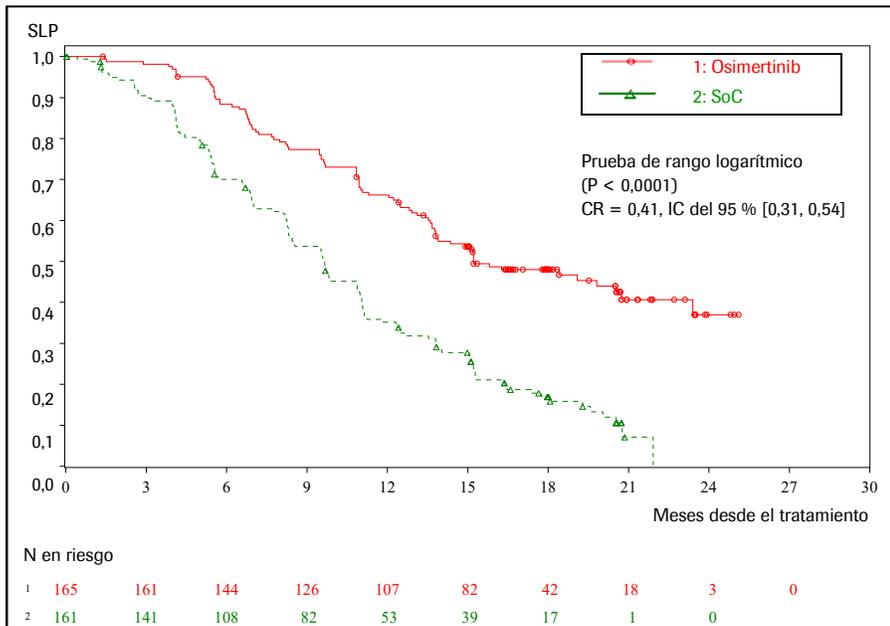
Se cribó un total de 994 pacientes en el estudio FLAURA¹⁰: 556 se aleatorizaron en el ensayo clínico y 438 no pasaron el cribado. De los 556 pacientes aleatorizados en FLAURA, 537 resultaron aptos para el análisis en el estudio. De los 537 pacientes aptos para el estudio, 276 se aleatorizaron mediante una prueba de tejido **cobas** EGFR central, 254 de los cuales presentaron una muestra de plasma recogido en K2 EDTA disponible para el análisis con 190 positivos para la prueba de plasma **cobas** EGFR (pEGFRm+); 261 se aleatorizaron mediante una prueba de tejido local, 242 de los cuales presentaron una muestra de plasma disponible para el análisis con 169 positivos para la prueba de plasma **cobas** EGFR (136 positivos para la mutación EGFR en tejido con la prueba **cobas** (tEGFRm+), 1 negativo para la mutación EGFR en tejido con la prueba **cobas** (tEGFRm-) y 32 no válidos o no analizados mediante la prueba de tejido **cobas**).

En la población primaria de plasma (tEGFRm+ y pEGFRm+ mediante la prueba **cobas** EGFR, N = 326, 190 aleatorizados centralmente y 136 aleatorizados localmente), el CR fue de 0,41 (IC del 95 %: 0,31; 0,54) y el CR del GCA de FLAURA (tEGFRm+, N = 556), de 0,46 (IC del 95 %: 0,37; 0,58). Por tanto, la eficacia del fármaco para la población primaria de

07340761001-08ES

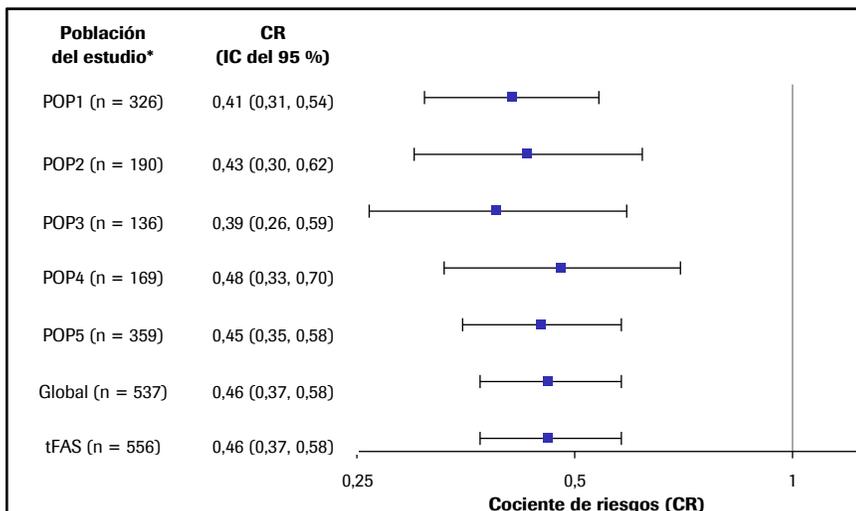
plasma se corresponde con la de la población del GCA de FLAURA. La Ilustración 17 presenta el gráfico de Kaplan-Meier para la población primaria de plasma con una delección en el exón 19 o una mutación L858R en una muestra de plasma.

Ilustración 17 Gráfico de Kaplan-Meier de la SLP mediante tratamiento para la población primaria de plasma de FLAURA (pacientes cobas tEGFR+ y cobas pEGFR+, n = 326)



La superioridad de TAGRISSO® sobre SoC fue consistente en todos los subgrupos positivos de plasma definidos por el estado de participación local y central en cobas tEGFR, con CR que oscilaban entre 0,39 y 0,48, además de ser consistente con el CR obtenido a partir de la población del GCA de FLAURA (CR = 0,46), tal como se muestra a continuación en la Ilustración 18.

Ilustración 18 Diagramas de bosque de CR para subgrupos de FLAURA definidos por el estado local y central en la prueba cobas EGFR



POP: población (subgrupo).

* POP1: todos los pacientes aleatorizados con una prueba de tejido **cobas** positiva y una prueba de plasma **cobas**.

POP2: pacientes aleatorizados mediante la prueba de tejido **cobas** y positivos también mediante la prueba de plasma **cobas**.

POP3: pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local y positivos también mediante la prueba de plasma y tejido **cobas**.

POP4: pacientes aleatorizados mediante una prueba de tejido local y positivos también mediante la prueba de plasma **cobas**.

POP5: todos los pacientes aleatorizados con una prueba de plasma **cobas** positiva.

Global: todos los pacientes aleatorizados, salvo 19 pacientes de China.

tFAS: todos los pacientes aleatorizados (grupo completo de análisis de FLAURA).

II. Análisis del estándar de atención de IRESSA®

Se realizó un análisis independiente con los pacientes del grupo del estándar de atención (SoC) tratados con IRESSA® (gefitinib). De todos los pacientes tratados con IRESSA® que obtuvieron una respuesta objetiva valorada por el investigador en FLAURA, 105 generaron resultados positivos mediante la prueba de plasma **cobas** a partir de muestras recogidas en K2 EDTA. La TRO de todos los pacientes positivos para la prueba de plasma **cobas** fue del 71,4 % (75/105, IC del 95 %: 62,2 % y 79,2 %, POP4 en la Tabla 42).

De los 105 pacientes con resultados positivos obtenidos a partir de la prueba de plasma **cobas**, 47 se aleatorizaron mediante la prueba de tejido **cobas** (población de eficacia primaria para la prueba de plasma **cobas**) y 58, mediante una prueba local. Se consideró que un total de 36 pacientes obtuvieron respuesta según la valoración del investigador en la población de eficacia primaria para la prueba de plasma **cobas** (n = 47), lo que generó una TRO del 76,6 % (IC del 95 %: 62,8 % y 86,4 %, POP1 en la Tabla 42).

La TRO fue del 62,2 % (28/45, IC del 95 %: 47,6 % y 74,9 %) en pacientes aleatorizados localmente positivos tanto mediante la prueba de tejido **cobas** como mediante la prueba de plasma **cobas** (POP2 en la Tabla 42). La TRO fue del 69,6 % (64/92, IC del 95 %: 59,5 % y 78,0 %) en todos los pacientes tratados con IRESSA® positivos tanto mediante la prueba de tejido **cobas** como la prueba de plasma **cobas** (POP3 en la Tabla 42). En la Ilustración 19, se muestra un diagrama de bosque de las TRO para las diferentes poblaciones de pacientes. Los resultados indican que el efecto del tratamiento con IRESSA®, basado en la prueba de plasma **cobas**, se mantuvo en cada subpoblación y fue consistente con los resultados obtenidos en el estudio de registro original (IFUM) para pacientes seleccionados para IRESSA®.¹³

Tabla 42 TRO para pacientes positivos para la prueba de plasma cobas tratados con IRESSA® en FLAURA

| Respuesta objetiva | Pacientes positivos para plasma (pEGFR+) en el grupo del SoC tratados con IRESSA® | | | | |
|----------------------|---|--|--------------|-------------------------------------|--|
| | pEGFR+ aleatorizados centralmente (cobas tEGFR+) | pEGFR+ aleatorizados localmente (Local tEGFR+) | | | Total |
| | | cobas tEGFR+ | cobas tEGFR- | cobas tEGFR No válido/ No analizado | |
| N.º de pacientes | 47 | 45 | 1 | 12 | 105 |
| Respuesta | 36 | 28 | 1 | 10 | 75 |
| Sin respuesta | 11 | 17 | 0 | 2 | 30 |
| TRO (%; IC del 95 %) | POP1 = 76,6 % (36/47: 62,8 %, 86,4 %) | POP2 = 62,2 % (28/45: 47,6 %, 74,9 %) | - | - | POP4 = 71,4 % (75/105: 62,2 %, 79,2 %) |
| | POP3 = 69,6 % (64/92: 59,5 %, 78,0 %) | | - | - | - |

Nota: tEGFR = tejido EGFR; pEGFR = plasma EGFR; IC = (porcentaje) intervalo de confianza.

POP: población (subgrupo).

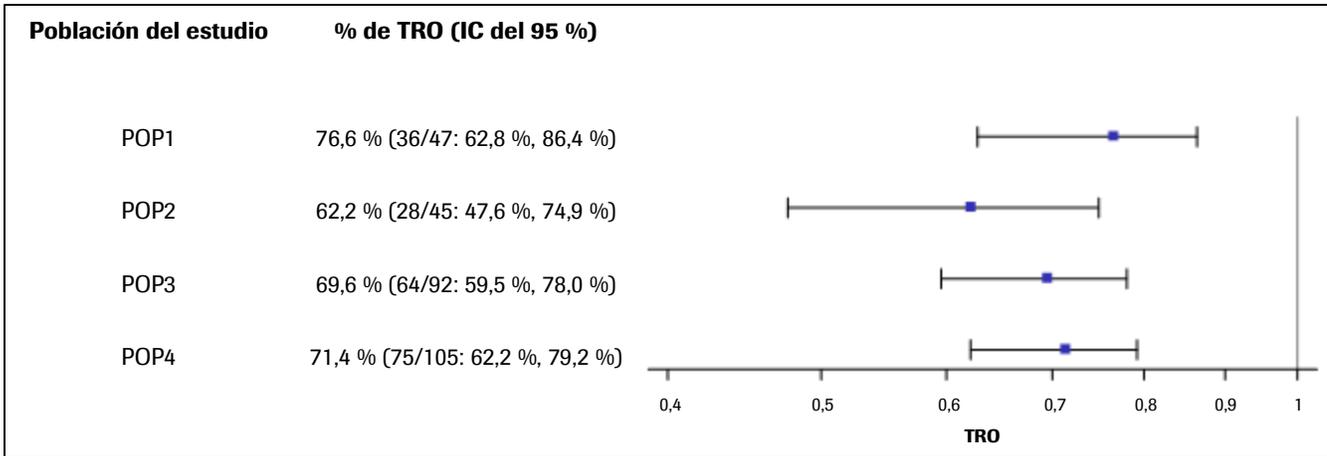
POP1: TRO para pacientes **cobas** pEGFR+ aleatorizados mediante la prueba de tejido **cobas** (población de eficacia primaria para la prueba de plasma **cobas**).

POP2: TRO para pacientes positivos para las pruebas de plasma y tejido **cobas** aleatorizados mediante una prueba de tejido local.

POP3: TRO para todos los pacientes positivos para las pruebas de plasma y tejido **cobas**.

POP4: TRO para todos los pacientes positivos para la prueba de plasma **cobas**.

Ilustración 19 Diagramas de bosque de TRO según la prueba cobas EGFR en plasma para diferentes poblaciones



POP: población (subgrupo).

POP1: TRO para pacientes **cobas** pEGFR+ aleatorizados mediante la prueba de tejido **cobas** (población de eficacia primaria para la prueba de plasma **cobas**).

POP2: TRO para pacientes positivos para las pruebas de plasma y tejido **cobas** aleatorizados mediante una prueba de tejido local.

POP3: TRO para todos los pacientes positivos para las pruebas de plasma y tejido **cobas**.

POP4: TRO para todos los pacientes positivos para la prueba de plasma **cobas**.

Avisos de resultados

Explicación de los avisos de resultados

El origen de un aviso se indica en el código del mismo, tal como se describe en la Tabla 43.

Tabla 43 Origen del aviso

| Inicio del código del aviso | Origen del aviso | Ejemplo |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------|
| M ^a | Múltiples motivos u otros motivos | M6 |
| R | Interpretación de los resultados | R20 |
| Z ^a | Analizador | Z1 |

^a Consulte el Manual de usuario del **cobas**® 4800 System o la Asistencia al usuario del **cobas**® 4800

Tabla 44 incluye todos los avisos de resultados del sistema relevantes para el usuario.

Tabla 44 Lista de los avisos de interpretación de resultados

| Código del aviso | Importancia | Descripción | Acción recomendada |
|--|-------------|--|---|
| R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847 | Error | No se ha podido detectar ninguna diana. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Este código de aviso indica que se ha producido un resultado negativo para la muestra (p. ej., es posible que no se haya añadido muestra a uno o más pocillos). |
| R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760 | Error | No se ha podido detectar el control de mutación. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo detectó un error que puede producirse con un patrón de fluorescencia atípico o ruidoso. |
| R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761 | Error | No se ha podido detectar el control de mutación. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha producido un resultado negativo para el control de mutación. Es posible que no se haya añadido ADN del control de mutación a uno o más pocillos. |
| R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762 | Error | El control de mutación está fuera de rango. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que un valor de Ct observado para el control de mutación se encontraba por encima del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado alto). Estos podrían ser los motivos: 1. Preparación incorrecta de la Master Mix de trabajo. 2. Error de pipeteo al añadir la Master Mix de trabajo a un pocillo de la microplaca. 3. Error de pipeteo al añadir el control de mutación a un pocillo de la microplaca. |
| R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763 | Error | El control de mutación está fuera de rango. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que un valor de Ct observado para el control de mutación se encontraba por debajo del umbral establecido (es decir, el codo era demasiado bajo). Este error podría producirse en caso de contaminación del ADN. |
| R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792 | Error | No se ha podido detectar el control negativo. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo detectó un error que puede producirse con un patrón de fluorescencia atípico o ruidoso. |

| Código del aviso | Importancia | Descripción | Acción recomendada |
|--|-------------|--|---|
| R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793 | Error | El control negativo está fuera de rango. | Repita la serie. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha producido un resultado positivo para el control negativo (es decir, se ha producido un evento de contaminación). |
| R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846 | Error | No se ha podido detectar ninguna diana. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo detectó un error que puede producirse con un patrón de fluorescencia atípico o ruidoso. |
| R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849 | Error | El resultado está fuera de rango. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha observado un valor de Ct anormalmente bajo para la muestra. |
| R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850 | Error | El resultado está fuera de rango. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que en la muestra se ha observado una relación atípica entre el valor de Ct de mutación y el valor de Ct del control interno. |
| R811, R831, R851 | Error | No se ha podido detectar el control interno. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el algoritmo de determinación de codo detectó un error que puede producirse con un patrón de fluorescencia atípico o ruidoso. |
| R812, R832, R852 | Error | No se ha podido detectar el control interno. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el resultado del control interno para la muestra no ha sido válido. La ausencia de un resultado de control interno válido sugiere lo siguiente: <ol style="list-style-type: none"> 1. ADN genómico de baja calidad de la muestra. 2. Procesamiento de muestra inadecuado. 3. Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. 4. Mutaciones poco frecuentes dentro de las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de control interno. 5. Es posible que no se haya añadido ADN de muestra a uno o más pocillos. 6. Otros factores. |
| R813, R834, R853 | Error | El control interno está fuera de rango. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que el resultado del control interno para la muestra no ha sido válido. La ausencia de un resultado de control interno válido sugiere lo siguiente: <ol style="list-style-type: none"> 1. ADN genómico de baja calidad de la muestra. 2. Procesamiento de muestra inadecuado. 3. Presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. 4. Mutaciones poco frecuentes dentro de las regiones del ADN genómico cubiertas por los cebadores y/o las sondas de control interno. 5. Es posible que no se haya añadido ADN de muestra a uno o más pocillos. 6. Otros factores. |

| Código del aviso | Importancia | Descripción | Acción recomendada |
|-------------------------|--------------------|---|--|
| R814, R835, R854 | Error | El control interno está fuera de rango. | Repita el análisis de la muestra. Consulte el apartado Procedimiento analítico . Estos códigos de aviso indican que se ha observado un valor de Ct del control interno anormalmente bajo para la muestra. Este error puede producirse si la mezcla de la PCR está sobrecargada con ADN genómico concentrado. |

Información adicional

Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

Tabla 45 Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos para diagnóstico mediante PCR de Roche

| | | |
|---|---|---|
|  Edad o fecha de nacimiento |  Dispositivo no apto para pruebas cerca del paciente |  UI de QS por reacción de PCR, utilice las unidades internacionales (UI) de QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados. |
|  Software auxiliar |  Dispositivo no apto para autoexamen |  Número de serie |
|  Intervalo asignado (copias/ml) |  Distribuidor <i>(Nota: el país o la región se indicará debajo de este símbolo.)</i> |  Centro |
|  Intervalo asignado (UI/ml) |  No deben reutilizarse |  Procedimiento estándar |
|  Representante autorizado en la Comunidad Europea |  Mujeres |  Esterilizado con óxido de etileno |
|  Hoja de datos del código de barras |  Para evaluación del rendimiento IVD únicamente |  Almacenar en la oscuridad |
|  Código de serie |  Global Trade Item Number (número mundial de un artículo comercial) |  Límite de temperatura |
|  Riesgo biológico |  Importador |  Archivo de definición de pruebas |
|  Número de catálogo |  Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> |  Este lado hacia arriba |
|  Marcado CE de conformidad; este dispositivo cumple con los requisitos aplicables para el marcado CE de un producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> . |  Límite inferior del intervalo asignado |  Procedimiento ultrasensible |
|  Fecha de recogida |  Hombres |  Identificación exclusiva del dispositivo |
|  Consulte las instrucciones de uso |  Fabricante |  Límite superior del intervalo asignado |
|  Suficiente para <n> pruebas |  Control negativo |  Línea de llenado de orina |
|  Contenido del kit |  Sin esterilizar |  Solamente para EE. UU.: la ley federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo autorizado o bajo prescripción médica. |
|  Control |  Nombre del paciente |  Fecha de caducidad |
|  Fecha de fabricación |  Número del paciente | |
|  Dispositivo para pruebas cerca del paciente |  Abrir aquí | |
|  Dispositivo para autoexamen |  Control positivo | |
| |  Copias QS por reacción de PCR, utilice copias QS por reacción de PCR para el cálculo de los resultados. | |

Asistencia técnica

Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con su afiliada local:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Fabricante

Tabla 46 Fabricante

Fabricado en los Estados Unidos



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Fabricado en los EE. UU.

Marcas registradas y patentes

COBAS, COBAS Z y AMPERASE son marcas comerciales de Roche.

El resto de nombres de productos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

La tecnología de prevención de contaminación cruzada de la enzima AmpErase está protegida por la patente estadounidense 7,687,247 propiedad de Life Technologies y con licencia para Roche Molecular Systems, Inc.

Determinadas secuencias de EGFR de este producto están cubiertas por una o varias patentes de Genzyme Corp., el Dana Farber Cancer Institute y la General Hospital Corporation y cuentan con licencia para Roche Molecular Systems, Inc. por la patente estadounidense 7,964,349 y otras patentes estadounidenses y extranjeras pendientes.

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

Copyright

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

Bibliografia

1. Sharma S. V., Bell D. W., Settleman J., Haber D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.
2. Pao W., Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):760-774.
3. Zhou C., Wu Y. L., Chen G., Feng J., Liu X. Q., Wang C., et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):735-42.
4. Paz-Ares L., Soulieres D., Melezinek I., Moecks J., Keil L., Mok T., et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):51-69.
5. Cheng L., Alexander R. E., Maclennan G. T., Cummings O. W., Montironi R., Lopez-Beltran A., et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*. 2012;25(3):347-69.
6. TARCEVA® (erlotinib) Package Insert.
7. Wu Y. L., Lee J. S., Thongprasert S., Yu C. J., Zhang L., Ladrera G., et al. Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(8):777-86.
8. TAGRISSO® (osimertinib) Package Insert.
9. Janne P. A., Yang J. C., Kim D. W., Planchard D., Ohe Y., Ramalingam S. S., et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-99.
10. Soria J-C, Vansteenkiste J, Reungwetwantana T, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 2018; 378:113-125.
11. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Jr, Morse D, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1212-1218.
12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu S, Saijo, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-957.
13. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br. J Ca* 2014;110:55-62.
14. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
15. Longo M. C., Berninger M. S., Hartley J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93(1):125-8.

16. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009:21-1112.
17. 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.
18. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
19. Costa D. B., Nguyen K. S., Cho B. C., Sequist L. V., Jackman D. M., Riely G. J., et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(21):7060-7.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D:Wayne, PA; CLSI, 2005.
22. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-46.
23. Goss G., Tsai C. M., Shepherd F. A., Bazhenova L., Lee J. S., Chang G. C., et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(12):1643-52.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved Guideline. CLSI Document EP-06A: Wayne, PA; CLSI, Apr 2003.

Revisión del documento

| Información de revisión del documento | |
|--|--|
| Doc Rev. 7.0 03/2022 | <p>Se han actualizado las instrucciones de almacenamiento de sangre total del apartado Recogida y manipulación de muestras correspondientes a Cell-Free DNA Collection Tube en el Apartado B.</p> <p>Se ha actualizado para reflejar los Operadores Económicos.</p> <p>Se ha incluido/actualizado el apartado Asistencia técnica.</p> <p>Se ha actualizado la página de símbolos armonizados.</p> <p>Se ha incluido la declaración "Fabricado en".</p> <p>Póngase en contacto con su representante local de Roche para cualquier consulta.</p> |