

cobas®



Rx Only

cobas® EGFR Mutation Test v2

In vitro diagnostik kullanım içindir



cobas® EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

FFPET örneklerinin hazırlanması için **cobas®** DNA Sample Preparation Kit'e (M/N 05985536190) bakın.

Plazma örneklerinin hazırlanması için **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit'e (M/N 07247737190) bakın.

İÇİNDEKİLER

Kullanım amacı.....	6
Test özeti ve açıklaması	7
Temel bilgiler	7
Prosedür prensipleri.....	9
Örneğin hazırlanması	9
PCR yoluyla amplifikasyon.....	9
BÖLÜM A: DOKU ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN.....	11
Malzemeler ve reaktifler	11
Sağlanan malzemeler ve reaktifler.....	11
Reaktif saklama ve kullanma	12
Diğer gerekli malzemeler	13
Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar	13
Önlemler ve taşıma gereklilikleri.....	13
Uyarılar ve önlemler	13
İyi laboratuvar uygulamaları.....	14
Kontaminasyon	14
Bütünlük	14
İmha	15
Dökülme ve temizleme	15
Örnek toplama, taşıma ve saklama.....	15
Örnek toplama.....	15
Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi.....	15
İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi	15
Test prosedürü.....	16
Testin uygulanması	16
Kullanım talimatları.....	16
Çalışma hacmi.....	16
Tam işlem kontrolü.....	16
DNA izolasyonu	16
Makrodiseksiyon	17
DNA kantitasyonu	17
Amplifikasyon ve saptama	17
Cihaz düzeneği.....	17
Test siparişi düzeneği.....	18
Örnek DNA stokunun dilüsyon hesaplaması	19
Örnek dilüsyonu.....	19

Reaksiyon düzeneği.....	20
PCR'nin başlatılması	21
Sonuçlar.....	22
Sonuçların yorumlanması.....	22
Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi.....	22
Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği.....	23
Mutant kontrolü.....	23
Negatif kontrol.....	23
Prosedür ile ilgili sınırlamalar	23
Klinik olmayan performans değerlendirmesi	24
Analitik hassasiyet – boş sınırı	24
FFPET örnek karışımlarını kullanarak Saptama Limiti.....	24
Minimum tümör içeriği	26
Diğer ekzon 18, 19, 20 ve 21 mutasyonları için çapraz reaktivite.....	27
EURTAC klinik araştırma örnekleri	27
AURA2 klinik araştırma örnekleri	27
Özgüllük – mikroorganizmalar ve EGFR homologları.....	27
Akciğerle ilişkili mikroorganizmalar.....	27
EGFR homologlarının plazmidleri	27
İnterferans	28
Nekrotik doku.....	28
Tekrarlanabilirlik.....	28
Örnek işlemenin tekrar üretilebilirliği	28
Klinik performans değerlendirmesi.....	29
Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması 1	29
Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması 2	30
EURTAC çalışmasından Faz III örneklerini kullanarak referans yönteme korelasyon.....	31
AURA2 çalışmasından Faz II örneklerini kullanarak referans yönteme korelasyon	33
Klinik sonuç verileri	34
EURTAC.....	34
AURA2.....	35
FLAURA	36
BÖLÜM B: PLAZMA ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN.....	40
Örneğin hazırlanması	40
Malzemeler ve reaktifler	40
Sağlanan malzemeler ve reaktifler.....	40
Reaktif saklama ve kullanma	41

Diğer gerekli malzemeler	42
Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar	42
Önlemler ve taşıma gereklilikleri.....	42
Uyarılar ve önlemler	42
İyi laboratuvar uygulamaları.....	43
Kontaminasyon	43
Bütünlük	43
İmha	44
Dökülme ve temizleme	44
Örnek toplama, taşıma ve saklama.....	44
Örnek toplama ve kullanma	44
Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi.....	45
İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi	45
Test prosedürü.....	46
Testin uygulanması	46
Kullanım talimatları.....	46
Çalışma hacmi.....	46
Tam işlem kontrolü.....	46
DNA izolasyonu	46
Amplifikasyon ve saptama	47
Cihaz düzeneği.....	47
Test siparişi düzeneği.....	47
Reaksiyon düzeneği.....	48
PCR'nin başlatılması	49
Sonuçlar.....	50
Sonuçların yorumlanması.....	50
Yarı-Kantitatif İndeks (SQI)	50
Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi.....	51
Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği.....	51
Mutant kontrolü	51
Negatif kontrol.....	51
Prosedür ile ilgili sınırlamalar	51
Klinik olmayan performans değerlendirmesi.....	53
Analitik performans	53
Analitik hassasiyet – boş sınırı	53
Hücre hattı DNA'sı kullanılarak saptama limiti	53

Diğer ekzon 18, 19, 20 ve 21 mutasyonları için çapraz reaktivite.....	54
AURA Uzatma çalışması ve AURA2 klinik araştırma örnekleri.....	54
Özgüllük – mikroorganizma.....	54
İnterferans	54
Doğrusallık	55
Tekrarlanabilirlik.....	58
Klinik performans değerlendirmesi.....	59
K2 EDTA plazma ile klinik tekrar üretilebilirlik.....	59
Roche cfDNA plazması ile klinik tekrar üretilebilirlik.....	60
KHDAK plazma örneklerini kullanarak Saptama Limiti (LoD)	61
Roche cfDNA plazmasının K2 EDTA plazmasına korelasyonu.....	62
ASPIRATION kohortundan Faz III plazma örneklerini kullanarak referans yönteme korelasyon	63
ENSURE çalışmasından Faz III örnekleri kullanılarak ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonlarının saptanması için cobas EGFR Test ile plazma ve doku örnekleri arasındaki korelasyon	64
AURA2 çalışmasından Faz II örneklerini kullanarak referans yönteme korelasyon	65
AURA2'den Faz II örnekleri kullanılarak T790M'nin saptanması için plazma ve doku örnekleri arasındaki korelasyon	66
Klinik sonuç verileri	67
ENSURE	67
AURA2.....	69
FLAURA	69
Sonuç işaretleri	73
Sonuç işaretlerinin açıklaması	73
Ek bilgiler	75
Semboller	75
Teknik destek.....	76
Üretici	76
Ticari markalar ve patentler.....	76
Telif hakkı.....	76
Referanslar	77
Belge revizyonu.....	79

Kullanım amacı

cobas® EGFR Mutation Test v2, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarında epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) geninin tanımlanan mutasyonlarını kalitatif olarak saptamaya yönelik gerçek zamanlı bir PCR testidir. Tanımlı EGFR mutasyonları, formalinle fiks edilmiş parafin bloklarda saklanan tümör dokusundan (FFPET) izole edilen DNA veya EDTA antikoagüle edilmiş periferik tam kandan elde edilmiş plazmadan dolaşımda bulunmayan tümör DNA'sı (cfDNA) kullanılarak saptanır.

Test, onaylı terapötik ürünün etiketlenmesine uygun şekilde EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (aşağıda Tablo 1 içinde listelenen hedefe yönelik tedaviler dahil) ile tedavi için KHDAK hastalarının seçilmesine yardımcı olma amaçlı, eşlik eden bir tanı olarak endikedir:

Tablo 1

İlaç	FFPET	Plazma
TARCEVA® (erlotinib)	Ekzon 19 delesyonları ve L858R	Ekzon 19 delesyonları ve L858R
TAGRISSO® (osimertinib)	Ekzon 19 delesyonları, L858R ve T790M	Ekzon 19 delesyonları, L858R ve T790M
IRESSA® (gefitinib)	Ekzon 19 delesyonları ve L858R	Ekzon 19 delesyonları ve L858R

Plazma örneklerinin test edilmesi, tümör biyopsisinin elde edilemediği hastalarda değerlendirme için uygundur. Plazma örnekleri kullanılarak bu testle bu mutasyonlar için negatif olan hastalar, rutin doku biyopsisine ve varsa, FFPET örnek tipiyle EGFR mutasyonları için teste yönlendirilmelidir.

cobas® EGFR Mutation Test v2 tarafından da saptanan aşağıdaki EGFR mutasyonları için ilaç güvenliliği ve etkililiği belirlenmemiştir:

Tablo 2

İlaç	FFPET	Plazma
TARCEVA® (erlotinib)	G719X, Ekzon 20 ekleme, T790M, S768I ve L861Q	G719X, Ekzon 20 ekleme, T790M, S768I ve L861Q
TAGRISSO® (osimertinib)	G719X, Ekzon 20 ekleme, S768I, ve L861Q	G719X, Ekzon 20 ekleme, S768I, ve L861Q
IRESSA® (gefitinib)	G719X, Ekzon 20 ekleme, T790M, S768I ve L861Q	G719X, Ekzon 20 ekleme, T790M, S768I ve L861Q

Plazma ile kullanım için **cobas® EGFR Mutation Test v2**, EGFR geninin 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarında yarı kantitatif bir ölçümünü içerir. Yarı kantitatif indeks (SQI) olarak bildirilen bu ölçüm, plazmadaki hedef mutant cfDNA miktarıyla bağlantılıdır ve belirli bir hasta için zaman içinde hedef mutant cfDNA yükündeki değişiklikleri saptamak için kullanılabilir.

Manuel örnek hazırlama için FFPET örnekleri, **cobas® DNA Sample Preparation Kit** kullanılarak işlenir ve plazma örnekleri, **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit** kullanılarak işlenir. Otomatik amplifikasyon ve saptama için **cobas® z 480** analizörü kullanılır.

Test özeti ve açıklaması

Temel bilgiler

EGFR'yi kodlayan gendeki aktive edici mutasyonlar, birincil olarak KHDAK'de meydana gelir ve EGFR proteininin kinaz aktivitesinin konstitütif aktivasyonu ile sonuçlanarak onkojenik işleme katkıda bulunur.¹ Bu mutasyonların KHDAK'nin seçilmemiş vakalarındaki prevalansı yaklaşık %10–30'dur.^{2,3} Bununla birlikte bu mutasyonlar, Asya kökenli adeno-karsinom histolojileri olan sigara içmeyen/az sigara içen kadın hastalarda daha sık görülür, ancak bunlarla sınırlı değildir.⁴

KHDAK'de en sık görülen EGFR mutasyonları, ekzon 19'daki çeşitli delesyonları ve ekzon 21'deki L858R yer değiştirme mutasyonunu içerir; bu mutasyonlar toplu olarak KHDAK'de gözlemlenen EGFR mutasyonlarının yaklaşık %85'ini oluşturur.⁵ **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (**cobas** EGFR Test), ekzon 18'de G719X yer değiştirme mutasyonlarını, ekzon 19'da delesyon mutasyonlarını, ekzon 20'de T790M ve S768I yer değiştirme mutasyonlarını, ekzon 20'de ekleme mutasyonlarını ve ekzon 21'de L858R ve L861Q yer değiştirme mutasyonlarını saptamak için tasarlanan gerçek zamanlı bir PCR testidir.

cobas EGFR Test, EGFR'nin kinaz aktivitesini tersine çevrilebilir şekilde inhibe eden, reseptörle bağlantılı tirozin kalıntılarının otofosforilasyonunu önleyen ve böylece hücre sağkalımını ve çoğalmasını destekleyen daha fazla aşağı akışlı sinyali inhibe eden bir bileşik olan TARCEVA® (erlotinib) için eşlik eden bir tanı testi olarak kullanılır. EGFR ekzon 19 delesyonu veya ekzon 21 L858R mutasyonları için TARCEVA®'nın bağlanma afinitesi, yabancıl tip reseptöre ilişkin afinitesinden daha yüksektir.⁶ Klinik araştırmalar, birinci basamak tedavi olarak TARCEVA® ile tedavi edilen ileri evre KHDAK hastalarının ve ekzon 19 delesyon mutasyonları veya ekzon 21 L858R yer değiştirme mutasyonları olan hastaların, kemoterapi ile tedavi edilen hastalara kıyasla klinik fayda görmelerinin muhtemel olduğunu göstermiştir.^{3,7}

cobas EGFR Test, ileri evre KHDAK'de hem EGFR TKI hassaslaştırıcı hem de T790M direnç mutasyonlarının geri dönüşümsüz bir inhibitörü olan TAGRISSO® (osimertinib) için eşlik eden bir tanı testi olarak kullanılır. TAGRISSO®, hücre proliferasyonunu, sağkalımı ve anjiyogenez destekleyen bir dizi intraselüler aşağı akışlı sinyal durumlarını inhibe eden EGFR'nin kinaz aktivitesini inhibe eder.⁸ Klinik araştırmalar, EGFR TKI hassaslaştırıcı mutasyonu olan ve birinci kuşak EGFR TKI ile tedaviyi takiben ilerleme gösteren ileri evre non-skuamöz KHDAK hastalarının ve ekzon 20'de bir T790M direnç mutasyonu geliştiren ve TAGRISSO® ile tedavi edilen hastaların klinik fayda görmelerinin muhtemel olduğunu göstermiştir.⁹ Bir faz III klinik araştırma, birinci basamak tedavi olarak TAGRISSO® ile tedavi edilen ileri evre KHDAK hastalarının (ekzon 19 delesyonu veya ekzon 21 L858R yer değiştirme mutasyonu pozitif), birinci kuşak EGFR TKI (gefitinib veya erlotinib) ile tedavi edilen hastalara kıyasla daha fazla klinik faydaya sahip olduğunu göstermiştir.¹⁰

cobas EGFR Test, EGFR'nin kinaz aktivitesini tersine çevrilebilir şekilde inhibe eden, reseptörle bağlantılı tirozin kalıntılarının otofosforilasyonunu önleyen ve böylece hücre sağkalımını ve çoğalmasını destekleyen daha fazla aşağı akışlı sinyali inhibe eden bir bileşik olan IRESSA® (gefitinib) için eşlik eden bir tanı testi olarak kullanılır. Klinik araştırmalar, birinci basamak tedavi olarak IRESSA® ile tedavi edilen ileri evre KHDAK hastalarının ve ekzon 19 delesyon mutasyonları veya ekzon 21 L858R yer değiştirme mutasyonları olan hastaların, kemoterapi ile tedavi edilen hastalara kıyasla klinik fayda görmelerinin muhtemel olduğunu göstermiştir.^{11, 12, 13}

Tablo 3 içinde **cobas** EGFR Test ile saptanan EGFR mutasyonları listelenmiştir.

Tablo 3 cobas EGFR Test, aşağıdaki mutasyonları saptamak için tasarlanmıştır

Ekzon	EGFR Mutasyon Grubu	EGFR Nükleik Asit Sekansı	HGVS* Protein Terimleri	HGVS* Nükleotid Terimleri	COSMIC ID ¹⁴
Ekzon 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
Ekzon 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
Ekzon 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
Ekzon 21	L858R	2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT	12429
	L861Q	2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)	LRG_304t1:c.2582T>A	6213

* HGVS – Human Genome Variation Society

Prosedür prensipleri

cobas EGFR Test, iki temel işleme dayanır: (1) FFPET veya plazmadan DNA elde etmek için manuel örnek hazırlama ve (2) tamamlayıcı primer çiftleri ve floresan boyalarla etiketlenmiş oligonükleotid problemleri kullanılarak hedef DNA'nın PCR amplifikasyonu ve saptaması. **cobas** EGFR Test, aşağıdaki mutasyonları saptamak için tasarlanmıştır:

- Ekzon 18: G719X (G719A, G719C ve G719S)
- Ekzon 19: delesyonlar ve kompleks mutasyonlar (bir delesyon ve bir eklemenin kombinasyonu olarak tanımlanır)
- Ekzon 20: S768I, T790M ve eklemeler
- Ekzon 21: L858R ve L861Q

Mutasyon saptaması, **cobas® z 480** analizöründe PCR analizi yoluyla elde edilir. Çalışmanın geçerliliğini doğrulamak için her çalışmaya bir mutant kontrol ve bir negatif kontrol dahil edilir.

Örneğin hazırlanması

cobas® DNA Sample Preparation Kit ve **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit, cam liflere bağlanan nükleik aside dayanarak sırasıyla FFPET ve plazmadan manuel örnek hazırlamada kullanılır. Bir proteaz ve kaotropik lizis/bağlanma tamponu, nükleik asitleri serbest bırakır ve serbest bırakılan DNA'yı DNazlardan korur. Ardından, lizis karışımına izopropanol eklenir ve daha sonra bir cam lif filtre eki ile bir kolon yoluyla santrifüjlenir. Santrifüjleme sırasında DNA, cam lif filtrenin yüzeyine bağlanır. Tuzlar, proteinler ve diğer hücresel safsızlıklar gibi bağlanmayan maddeler, santrifüjleme yoluyla giderilir. Adsorbe edilmiş nükleik asitler yıkanır ve ardından sulu bir çözelti ile elüte edilir. Daha sonra hedef DNA'ya amplifikasyon uygulanır ve **cobas** EGFR Test kitinde verilen amplifikasyon ve saptama reaktifleri kullanılarak **cobas® z 480** analizöründe saptanır.

PCR yoluyla amplifikasyon

Hedefin seçilmesi

cobas EGFR Test, her bir hedeflenen mutasyon için mutasyonların spesifik baz çifti sekanslarını tanımlayan primerleri kullanır. Ekzon 19 delesyon mutasyonları için 125 ile 141 baz çifti aralığındaki sekanslar hedeflenir; ekzon 21'deki L858R yer değiştirme mutasyonu için 138 baz çifti sekansı hedeflenir; ekzon 20'deki T790M yer değiştirme mutasyonu için 118 baz çifti sekansı hedeflenir; ekzon 18'deki G719X yer değiştirme mutasyonu için 104–106 baz çifti aralığındaki sekanslar hedeflenir; ekzon 20'deki S768I yer değiştirme mutasyonu için 133 baz çifti sekansı hedeflenir; ekzon 20 eklemeler mutasyonları için 125 ila 143 baz çifti aralığındaki sekanslar hedeflenir; ekzon 21'deki L861Q yer değiştirme mutasyonu için 129 baz çifti sekansı hedeflenir. Amplifikasyon, yalnızca primerler arasındaki EGFR geni bölgelerinde meydana gelir; tüm EGFR genine amplifikasyon uygulanmaz.

Hedef amplifikasyon

Hedef amplifikasyon için *Thermus* türü Z05-AS1 DNA polimeraz türevi kullanılır. İlk olarak, PCR karışımı, DNA'yı denatüre etmek ve primer hedef sekanslarını açığa çıkarmak için ısıtılır. Karışım soğuduğu zaman, yukarı yönlü ve aşağı yönlü primerler, hedef DNA sekanslarıyla yeniden birleşir. Z05 DNA polimerazı, divalent metal katyonu ve fazla dNTP olması halinde, ikinci DNA zincirini sentezleyerek her bir bağlanmış primeri uzatır. Bu durum PCR'nin birinci döngüsünü tamamlayarak EGFR geninin hedeflenen baz çifti bölgelerini içeren çift zincirli bir DNA kopyası üretir. Bu işlem birkaç döngü boyunca tekrarlanır ve her bir döngü, ampikon DNA'nın miktarını etkili bir şekilde iki katına çıkarır.

Otomatik gerçek zamanlı mutasyon saptaması

cobas EGFR Test, gerçek zamanlı PCR teknolojisini kullanır. Reaksiyondaki her hedefe özgü oligonükleotid probu, haberci işlevi görev floresan bir boya ve intakt bir prob içerisindeki haberci boyadan gelen floresan emisyonları absorbe eden (söndüren) bir söndürücü molekül ile işaretlenir. Her bir amplifikasyon döngüsü esnasında, amplikondaki tek zincirli DNA sekansına tamamlayıcı prob bağlanır ve ardından Z05-AS1 DNA Polimerazın 5' ile 3' nükleaz aktivitesiyle bölünür. Haberci boya bu nükleaz aktivitesi ile söndürücüden ayrıldığında, haberci boya uygun ışık spektrumu ile uyarıldığında karakteristik bir dalga boyunun floresansı ölçülebilir. Testle hedeflenen mutasyonların etiketlenmesi için dört farklı haberci boya kullanılır. Hedeflenen yedi EGFR sekansının amplifikasyonu, özel optik kanallarda dört karakteristik dalga boyunda floresansın ölçülmesiyle üç reaksiyon boyunca bağımsız olarak saptanır.

Selektif amplifikasyon

Örnekten gelen hedef nükleik asidin selektif amplifikasyonu **cobas** EGFR Test'te, AmpErase (urasil-N-glikozilaz) enzimi ve deoksiüridin trifosfat (dUTP) kullanılarak gerçekleştirilir.¹⁵ AmpErase enzimi, timidin içeren DNA'yı değil, deoksiüridin içeren DNA zincirlerini tanıır ve bunların yıkımını katalize eder. Deoksiüridin doğal oluşumlu DNA'da yoktur ancak Master Mix reaktiflerinde nükleotid trifosfatlardan birisi olarak deoksitimidin trifosfatın yerine dUTP kullanıldığı için amplikon DNA'da her zaman mevcuttur; bu nedenle sadece amplikon, deoksiüridin içerir. Deoksiüridin, kontamine edici amplikonu, hedef DNA'nın amplifiye edilmesi öncesinde AmpErase enzimiyle yıkılmaya maruz bırakır. Master Mix reaktiflerinde yer alan AmpErase enzimi, C1 konumunda deoksiriboz zincirini açarak deoksiüridin kalıntılarındaki deoksiüridin içeren DNA'nın bölünmesini katalize eder. Alkalın pH'da birinci ısıl çevrim aşamasında ısıtıldığında, amplikon DNA zinciri deoksiüridinin konumunda kırılır, böylece DNA'nın amplifiye edilemez olmasını sağlar. AmpErase enzimi, 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, yani termal döngü aşamalarının tümünde inaktiftir ve böylece hedef amplikonu yıkmaz. **cobas** EGFR Test'in deoksiüridin içeren EGFR mutant amplikonunu inaktive ettiği gösterilmiştir.

DOKU ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN BÖLÜM A'DA VERİLEN TALİMATLARI TAKİP EDİN.

PLAZMA ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN BÖLÜM B'DE VERİLEN TALİMATLARI TAKİP EDİN.

BÖLÜM A: DOKU ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN

Doku örneklerinden DNA'nın izole edilmesi için cobas® DNA Sample Preparation Kit'e (M/N 05985536190) bakın.

Malzemeler ve reaktifler

Sağlanan malzemeler ve reaktifler

Kit/Kasetler	Bileşenler ve Reaktif İçerikleri	Test Başına Kullanılan Miktar	Güvenlik Sembolü ve Uyarı
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 test (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N 06471366001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N 06471382001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok

Kit/Kasetler	Bileşenler ve Reaktif İçerikleri	Test Başına Kullanılan Miktar	Güvenlik Sembolü ve Uyarı
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 test (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N 07248610001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok
	MGAC (Magnezyum asetat) (M/N 05854326001) Magnezyum asetat %0,09 sodyum azid	6 × 0,2 mL	Yok
	EGFR MC (EGFR Mutant Kontrolü) (M/N 06471455001) Tris tamponu EDTA Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azid < %0,1 EGFR ekzonu 18, 19, 20 ve 21 sekanslarını içeren plazmid DNA (mikrobik) < %0,1 EGFR yabancıl tip DNA (hücre kültürü)	6 × 0,1 mL	Yok
	DNA SD (DNA Örnek Dilüenti) (M/N 05854474001) Tris-HCl tamponu %0,09 sodyum azid	2 × 3,5 mL	Yok

Reaktif saklama ve kullanma

Reaktif	Saklama sıcaklığı	Saklama Süresi
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2°C ila 8°C	Açıldığında 90 gün içindeki 4 kullanıma kadar veya son kullanma tarihine kadar (hangisi önceyse) stabildir.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** ve çalışma MMX (**MGAC**'nin **EGFR MMX-1** veya **EGFR MMX-2** veya **EGFR MMX-3 v2**'ye eklenmesiyle hazırlanır) uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır. Çalışma MMX'i 2°C ila 8°C'de karanlık bir yerde muhafaza edilmelidir. Hazırlanan örnekler ve kontroller, çalışma MMX'i hazırlandıktan sonra 1 saat içinde eklenmelidir. İşlenen örnekler ve kontroller çalışma MMX'ine eklendikten sonra 1 saat içinde amplifikasyon başlatılmalıdır.

Diğer gerekli malzemeler

Malzemeler	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Çamaşır suyu	Herhangi bir satıcı
%70 Etanol	Herhangi bir satıcı
cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plakası (AD plakası) ve kapatıcı film	Roche 05232724001
cobas® 4800 Sistemi kapatıcı film aplikatörü (cobas® 4800 Sisteminin montajıyla sağlanır)	Roche 04900383001
Ayarlanabilen pipetleyiciler* (5–1000 µL pipetleme yapabilir)	Herhangi bir satıcı
Aerosol bariyer veya pozitif yer değiştirmeli DNase içermeyen uçlar	Herhangi bir satıcı
Kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL steril, RNase/DNase içermeyen, PCR sınıfı)	Herhangi bir satıcı
Mikrosantrifüj tüpü rakları	Herhangi bir satıcı
DNA konsantrasyonunun ölçülmesi için spektrofotometre*	Herhangi bir satıcı
Vorteks karıştırıcı*	Herhangi bir satıcı
Tek kullanımlık eldivenler, pudrasız	Herhangi bir satıcı
-25°C ila -15°C saklama kapasiteli dondurucu	Herhangi bir satıcı

* Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmelidir.

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar

Gerekli cihaz ve yazılımlar, sağlanmamıştır
cobas® z 480 analizör
cobas® 4800 Sistem Kontrol Ünitesi ve Sistem Yazılımı sürümü 2.2 veya üstü
EGFR Doku P1 Analiz Paketi Yazılım versiyonu 1.0 veya üstü*
Barkod Okuyucu uzat. USB
Yazıcı

* Mevcut yazılım sürümü için **cobas®** EGFR Mutation Test v2 kiti Ürün Bilgi Kartına (M/N: 07335873001) bakın.

Ayrı satılan materyallerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar uygulamaları esastır.

- Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.
- Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinizden temin edilebilir.
- Bu test, FFPET KHDAK örnekleriyle kullanım içindir. Numuneler, Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyogüvenlik (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*)¹⁶ ve CLSI Belgesi M29-A4'te¹⁷ tanımlanan güvenli laboratuvar prosedürleri kullanılarak enfeksiyöz madde gibi değerlendirilmelidir.
- Steril tek kullanımlık pipetlerin ve DNase içermeyen pipet uçlarının kullanılması önerilir.

İyi laboratuvar uygulamaları

- Ağzınızla pipetleme yapmayın.
- Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- Örneklerle ve kit reaktifleriyle işlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu malzemelerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçınin. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- Distile veya deiyonize suya %0,5 oranında sodyum hipoklorit ekleyerek taze hazırlayacağınız çözeltiyle laboratuvaradaki tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve dezenfekte edin (ev temizliği için kullanılan çamaşır suyunu 1:10 oranında seyreltin). Bunun ardından %70 etanol içeren çözeltiyle yüzeyi silin.

Not: *Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.*

Kontaminasyon

- Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı numunelerle ve **cobas** EGFR Test reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir. Numunelerle işlem yaparken kontamine edici eldiven kullanmaktan kaçınin.
- Eldivenler, kontaminasyon potansiyelini azaltmak için sık değiştirilmelidir.
- DNA izolasyon alanlarından ayrılmadan önce veya çözeltilerle veya bir örnekle temas edildiğinden şüpheleniliyorsa eldivenler değiştirilmelidir.
- Reaktiflerin mikrobik ve ribonükleaz kontaminasyonundan kaçınin.
- Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Her aktiviteye ayrı malzemeler ve ekipmanlar hazırlanmalıdır ve bu malzemeler ve ekipmanlar diğer aktiviteler için kullanılmamalıdır veya alanlar arasında hareket ettirilmemelidir. Örneğin, DNA izolasyonu için kullanılan pipetler ve malzemeler amplifikasyon ve saptama işlemlerine yönelik reaktifleri hazırlamak için kullanılmamalıdır.
- Laboratuvaradaki iş akışının tek yönlü olarak ilerlemesi, bir sonraki aktiviteye geçmeden önce hali hazırda aktivitenin tamamlanması önemle tavsiye edilir. Örneğin, amplifikasyon ve saptama işlemlerine geçmeden önce DNA izolasyonu tamamlanmalıdır. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve saptama işlemleri için kullanılacak alandan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Çalışma master mix'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için çalışma master mix'inin hazırlanması öncesinde amplifikasyon ve saptama çalışma alanı tümüyle temizlenmelidir.

Bütünlük

- Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Farklı kitlerden veya lotlardan alınan reaktifleri birlikte kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

İmha

- MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC ve DNA SD, sodyum azid içerir. Sodyum azid, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azidler oluşturabilir. Laboratuvardaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azid atılırken, azid birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
- Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.

Dökülme ve temizleme

- cobas® 4800 cihazında dökülme meydana gelirse, temizlemek için uygun cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzu veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı içinde verilen talimatları takip edin.
- cobas® z 480 analizörü temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. cobas® z 480 analizörü, cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzunda veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı içinde açıklanan prosedürlere göre temizleyin.
- cobas® z 480 analizörünün kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Örnek toplama, taşıma ve saklama

Not: Tüm örnekleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

Örnek toplama

KHDAK FFPET örnekleri, cobas EGFR Test ile kullanım için doğrulanmıştır.

Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi

KHDAK FFPET örnekleri, 15°C ila 30°C'de taşınabilir. FFPET örneklerinin taşınması etiyolojik ajanların taşınmasıyla ilgili ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.¹⁸

FFPET örneklerinin stabilitesi, 15°C ila 30°C'de saklandığında, toplama tarihinden itibaren 12 aya kadar doğrulanmıştır. Slaytlara takılan beş µm'lik kesitler, 15°C ila 30°C'de 60 güne kadar saklanabilir.

FFPET örnekleri, aşağıdakilerden biri için stabildir:

FFPET Örnek Tipi	FFPET Bloğu	5 µm FFPET Kesiti
FFPET Örnek Saklama Sıcaklığı	15°C ila 30°C	15°C ila 30°C
Saklama Süresi	12 aya kadar	60 güne kadar

İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi

İşlenmiş örnekler (ekstrakte edilen DNA), aşağıdakilerden birinde stabildir:

Ekstrakte Edilmiş DNA Saklama Sıcaklığı	-15°C ila -25°C	2°C ila 8°C	15°C ila 30°C
Saklama Süresi	60 gün boyunca 3 kez dondurma/çözmeye kadar	14 güne kadar	1 güne kadar

Ekstrakte edilmiş DNA, önerilen saklama dönemleri içinde ya da DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan cobas® DNA Sample Preparation Kit'in son kullanma tarihinden önce (hangisi ilk önce gelirse) kullanılmalıdır.

07340761001-03TR

Doc. Rev. 8.0

Test prosedürü

Testin uygulanması

Şekil 1 cobas® DNA Sample Preparation Kit ile cobas EGFR Test iş akışı

1	Sistemi başlatın
2	Cihaz bakımını gerçekleştirin
3	Örnekleri ve reaktifleri depodan çıkarın
4	Örnekleri parafinden arındırın
5	DNA izolasyonunu gerçekleştirin
6	DNA'yı elüte edin
7	İş siparişi oluşturun ve plaka yerleşim planının çıktısını alın
8	Amplifikasyon reaktiflerini hazırlayın
9	AD plakasına amplifikasyon reaktiflerini yerleştirin
10	AD plakasına örneği yerleştirin
11	AD plakasını kapatın
12	AD plakasını cobas® z 480 analizöre yerleştirin
13	Çalışmayı başlatın
14	Sonuçları gözden geçirin
15	LIS ile: sonuçları LIS'e gönderin
16	Analizörü boşaltın

Kullanım talimatları

Not: *cobas EGFR Test'te yalnızca bölgeye göre en az %10 tümör içeriği olan 5 µm kalınlığındaki KHDAK FFPET kesitleri kullanılmalıdır. Bölgeye göre %10'dan az tümör içeriği olan herhangi bir örnek, parafinden arındırıldıktan sonra makrodiseksiyona tabi tutulmalıdır.*

Not: *cobas® z 480 analizörünün ayrıntılı çalıştırma talimatları için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.*

Çalışma hacmi

Tek bir çalışma döngüsü, 96 kuyucuklu mikrokuyucuk plakası başına 1 ila 30 örnek (artı kontroller) içerebilir. 24'ten fazla örnekle çalışırken birden fazla **cobas EGFR Test** kiti gerekli olacaktır.

cobas EGFR Test, kit başına maksimum 24 örnek için 3 örneğin (artı kontroller) 8 çalışması için yeterli reaktif içerir.

Tam işlem kontrolü

Bu test, tam işlemli bir negatif kontrolü gerektirir. Her çalışma için, **DNA izolasyon** prosedüründen başlayarak örnek(ler) ile eşzamanlı bir negatif kontrol işleyin.

DNA izolasyonu

DNA, **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190) kullanılarak FFPET örneklerinden izole edilir.

Makrodiseksiyon

Örnek, alana göre %10'dan az tümör içeriğine sahipse örnek hazırlamanın bir parçası olarak makrodiseke edilmelidir.

DNA kantitasyonu

Not: DNA konsantrasyonunun ölçümü, DNA izolasyon prosedüründen hemen sonra ve saklamadan önce yapılmalıdır.

Not: DNA stokunu **Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi** bölümündeki talimatlara göre saklayın.

1. Her DNA stokunu 5 saniye vorteksleyerek karıştırın.
2. Üreticinin protokolüne göre bir spektrofotometre kullanarak DNA'yı kantifikasyona tabi tutun. Cihaz için kör olarak **cobas®** DNA Sample preparation kit'ten **DNA EB**'yi kullanın. İki tutarlı okumanın ortalaması gereklidir. DNA konsantrasyonu okumaları $\geq 20,0$ ng/ μ L olduğunda iki ölçüm birbirinin $\pm 10\%$ 'u içinde olmalıdır. $< 20,0$ ng/ μ L DNA konsantrasyon değerlendirmeleri için iki ölçüm, ± 2 ng/ μ L dahilinde olmalıdır. DNA konsantrasyonu okumaları $\geq 20,0$ ng/ μ L olduğunda iki ölçüm birbirinin $\pm 10\%$ 'u içinde değilse veya DNA konsantrasyonu okumaları $< 20,0$ ng/ μ L olduğunda ± 2 ng/ μ L içinde değilse, gereksinimler karşılanıncaya kadar ek 2 okuma alınmalıdır. Daha sonra bu iki yeni ölçümün ortalaması hesaplanmalıdır.

Not: İşlenmiş negatif kontrolden (**NEG**) alınan DNA stokunun ölçülmesine gerek yoktur.

3. Örneklerdeki DNA stoku konsantrasyonu, **cobas** EGFR Test'in gerçekleştirilmesi için ≥ 2 ng/ μ L olmalıdır. Her amplifikasyon/saptama için 2 ng/ μ L DNA stoku dilüsyonunun 25 μ L'si (toplam 50 ng DNA) kullanılarak örnek başına üç amplifikasyon/saptama çalıştırılır.

Not: Her DNA stoku, **cobas** EGFR Test'in gerçekleştirilmesi için minimum 2 ng/ μ L konsantrasyona sahip olmalıdır. DNA stok konsantrasyonu < 2 ng/ μ L ise, bu örnek için parafinden ayırma işlemini, DNA izolasyonunu ve DNA kantitasyon prosedürlerini iki adet 5 μ m'lik FFPET kesiti kullanarak tekrarlayın. Takılan numuneler için, parafinden arındırdıktan sonra her iki kesitten alınan dokuyu tek bir tüpte birleştirin, dokuyu **cobas®** DNA Sample Preparation Kit'te **TLB + PK**'ya daldırın ve DNA izolasyonunu ve kantitasyonu gerçekleştirin. Takılmamış örnekler için, her iki kesitten alınan dokuyu tek bir tüpte birleştirin ve parafinden arındırma, DNA izolasyonu ve kantitasyonu gerçekleştirin. DNA stoku hala < 2 ng/ μ L ise, ilgili klinik merkezden başka bir FFPET örnek kesiti talep edin.

Amplifikasyon ve saptama

Not: Çalışma MMX'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için, amplifikasyon ve saptama işlemleri DNA izolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir. Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.

Cihaz düzeneği

cobas® z 480 düzeneğinin ayrıntılı talimatları için **cobas® 4800 Sistemi** – Kullanım Kılavuzuna veya **cobas® 4800 Sistemi** – Kullanıcı Yardımına bakın.

Test siparişi düzeneği

EGFR iş akışı adımlarıyla ilgili ayrıntılı talimatlar için **cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına** bakın.

Çalışmadaki tüm örnek ve kontrollerin konumunu içeren bir plaka yerleşim haritası oluşturun. Yalnızca doku örneklerini içeren bir çalışmada Mutant Kontrol, plaka üzerinde **A01–A03** konumlarına yüklenir. Negatif Kontrol, plaka üzerinde **B01–B03** konumlarına yüklenir. Seyreltilmiş örnekler daha sonra Şekil 2’inde gösterildiği gibi **C01–C03**’ten başlayarak **H10–H12**’ye kadar 3 sütunluk setler halinde eklenir.

cobas EGFR Test, karışık test modunda çalıştırılabilir (ör., EGFR Tissue ile EGFR Plasma). Kontrol konumları, seçilen testlere ve örnek numaralarına göre farklılık gösterebilir. Karışık test çalışması düzeneği hakkında ayrıntılı bilgi için **cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına** bakın.

Şekil 2 cobas EGFR Test için plaka yerleşim düzeni

Satır/ Sütun	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

Burada: MC = Mutant Control, NEG = Negatif Kontrol; S# = örnek kimliği ve MMX #, Master Mix Reagent 1, 2 veya 3 v2’yi belirtir.

Not: Yanıt oluşturmak için herhangi bir örnek, bir satırda art arda gelen üç sütuna yayılmalıdır.

Not: Çalışma Master Mix 1, plaka üzerinde 01, 04, 07 ve 10 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 2, plaka üzerinde 02, 05, 08 ve 11 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 3 v2, plaka üzerinde 03, 06, 09 ve 12 sütunlarına yüklenmelidir.

Not: Tek plakaya 30’a kadar örnek yüklenebilir. Plakadaki tüm örnekleri işlemek için birden fazla reaktif kiti gerekiyorsa, kitlerin tümü aynı lottan olmalıdır.

Örnek DNA stokunun dilüsyon hesaplaması

2 ng/μL ila 36 ng/μL DNA stoku konsantrasyonları için dilüsyon hesaplaması

Not: Örneklerden alınan DNA stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

Not: 2 ng/μL DNA stoku dilüsyonunun (toplam 150 ng DNA) toplam hacminin 75 μL (üç reaksiyonun her biri için 25 μL) olmasını gerektiren her örnek için üç amplifikasyon/saptama yapılır.

- Her örnek için gereken DNA stokunun hacmini (μL) hesaplayın:
$$\mu\text{L DNA stoku} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{DNA stoku konsantrasyonu [ng}/\mu\text{L}]$$
- Her örnek için gereken **DNA SD** hacmini (μL) hesaplayın:
$$\mu\text{L DNA SD} = 90 \mu\text{L} - \mu\text{L DNA stoku}$$

Örnek:

DNA stoku konsantrasyonu = 6,5 ng/μL

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

>36 ng/μL olan DNA stoku konsantrasyonları için dilüsyon hesaplaması

Not: Örneklerden alınan DNA Stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

Not: 2 ng/μL DNA stoku dilüsyonunun (toplam 150 ng DNA) toplam hacminin 75 μL (üç reaksiyonun her biri için 25 μL) olmasını gerektiren her örnek için üç amplifikasyon/saptama yapılır.

- > 36 ng/μL DNA Stoku konsantrasyonu için, en az 90 μL seyreltilmiş DNA stoku hazırlamak için gereken **DNA SD** miktarını hesaplamak üzere aşağıdaki formülü kullanın. Bu, her örnekte minimum 5 μL DNA stoku kullanılmasını sağlama amaçlıdır.
- Her örnek için 5 μL DNA stokunu 2 ng/μL'ye seyreltmek için gereken **DNA SD** hacmini (μL) hesaplayın:
$$\mu\text{L cinsinden gerekli DNA SD hacmi} = ((5 \mu\text{L DNA stoku} \times \text{ng}/\mu\text{L cinsinden DNA stok konsantrasyonu}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L}$$

Örnek:

DNA stoku konsantrasyonu = 100 ng/μL

- $$\mu\text{L cinsinden gerekli DNA SD hacmi} = ((5 \mu\text{L} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L} = 245 \mu\text{L}$$
- 5 μL DNA stokunu seyreltmek için hesaplanan **DNA SD** hacmini kullanın.

Örnek dilüsyonu

- DNA Dilüsyonları için uygun sayıda 1,5 mL'lik kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüplerini uygun örnek tayiniyle etiketleyerek hazırlayın.
- Aerosole dirençli uçlu bir pipet kullanarak, hesaplanan **DNA SD** hacimlerini sırasıyla etiketlenmiş tüplere pipetleyin. **NEG** olarak etiketlenmiş, kilitli kapaklı bir mikrosantrifüj tüpüne 45 μL **DNA SD** pipetleyin.
- Her DNA sokunu ve negatif kontrolü 5 ila 10 saniye vorteksleyin.
- Aerosole dirençli pipet ucuna sahip bir pipet kullanarak (her pipetleme için yeni uç), her DNA stokunun hesaplanan hacmini **DNA SD** içeren ilgili tüpe yavaşça pipetleyin. Negatif kontrolün 45 μL'sini (ekstrakte edilen elüat) **NEG** tüpüne pipetleyin.
- Tüplerin kapağını kapatın ve her birini 5 ila 10 saniye vorteksleyin.
- Eldivenleri değiştirin.

Reaksiyon düzeneği

Çalışma master mix'lerinin hazırlanması (MMX-1, MMX-2 ve MMX-3 v2)

Not: *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ve çalışma MMX'i ışığa karşı duyarlıdır ve uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır.*

Not: *Çalışma MMX'i ve EGFR MMX reaktiflerinin viskozitesinden ötürü, tüm karışımın uçtan tamamen dağıtıldığından emin olmak için yavaşça pipetleyin.*

Not: *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 ve EGFR MMX-3 v2, açık mavi/morumsu renkte görülebilir. Bu durum reaktifin performansını etkilemez.*

Ayrı 1,5 mL kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüplerinde biri EGFR MMX-1, biri EGFR MMX-2 ve diğeri EGFR MMX-3 v2 içeren üç bulk çalışma MMX'i hazırlayın.

1. Aşağıdaki formülü kullanarak her çalışma MMX'i için gerekli olan EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2 hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli olan EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2 hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 20 \mu\text{L}$$

2. Aşağıdaki formülü kullanarak her çalışma MMX'i için gerekli MGAC hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli MGAC hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 5 \mu\text{L}$$

Çalışmaya dahil edilen örnek sayısına bağlı olarak çalışma MMX'inin hazırlanması için gereken her reaktifin hacmini belirlemek için Tablo 4 kullanın.

Tablo 4 Çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için gerekli olan reaktiflerin hacimleri

		Örneklerin Sayısı*									
		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
Her Çalışma MMX'i için Toplam Hacim (µL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Örneklerin Sayısı için hacimler, Örneklerin Sayısı + 2 Kontrol + 1 toplamına dayanır

3. Uygun sayıda EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ve MGAC flakonlarını 2°C ila 8°C sıcaklıktaki depodan çıkarın. Her reaktifi 5 saniye vorteksleyin ve kullanmadan önce tüpün altındaki sıvıyı toplayın. Çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için steril bir mikrosantrifüj tüpünü etiketleyin.
4. EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2'nin hesaplanan hacmini ilgili çalışma MMX'i tüpüne ekleyin.
5. MGAC'nin hesaplanan hacmini çalışma MMX'i tüplerine ekleyin.
6. Yeterli karışımı sağlamak için tüpleri 3 ila 5 saniye vorteksleyin.

Not: *Örnekler ve kontroller, çalışma MMX'leri hazırlandıktan sonra 1 saat içinde AD plakasına eklenmelidir.*

Not: *Sadece cobas® 4800 Sistemi AD plakası ve Kapatıcı film kullanın.*

Plakanın hazırlanması

1. Çalışma için gerekli olan AD plakasının her reaksiyon kuyucuğuna 25 µL çalışma MMX'i pipetleyin. Pipet ucunun kuyucuğun dışındaki plakaya temas etmesine izin vermeyin.
 - 01, 04, 07 ve 10 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-1'i (EGFR MMX-1 içeren) ekleyin.
 - 02, 05, 08 ve 11 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-2'i (EGFR MMX-2 içeren) ekleyin.
 - 03, 06, 09 ve 12 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-3 v2'yi (EGFR MMX-3 v2 içeren) ekleyin.
2. 25 µL EGFR MC'yi AD plakasının A01, A02 ve A03 kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.
3. Yeni bir pipet ucu kullanarak, 25 µL NEG'i AD plakasının B01, B02 ve B03 kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.

Not: Her çalışma A01, A02 ve A03 kuyucuklarında EGFR MC ve B01, B02 ve B03 kuyucuklarında NEG içermelidir aksi halde çalışma cobas® z 480 analizörü tarafından geçersiz kılınacaktır.

Not: Örnekten örneğe geçebilecek kontaminasyona veya PCR reaksiyon tüpü kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için gerektiği biçimde eldivenlerinizi değiştirin.

4. Her seyreltilmiş örnek DNA'sı için yeni pipet uçları kullanarak, örnek DNA'sının her bir kuyucuğa eklenmesi için yeni bir uç kullanarak AD plakasının C01, C02 ve C03 kuyucuklarına ilk örnek DNA'sından 25 µL ekleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak her kuyucuğu iyice karıştırın. Bu prosedürü her örnekteki DNA için tekrarlayın ve tüm DNA örnek dilüsyonları AD plakasına yüklenene kadar Şekil 2 içindeki şablonu takip edin. Tüm sıvının kuyucukların tabanında toplandığından emin olun.
5. AD plakasını kapatıcı film (plakalarla birlikte verilen) ile örtün. Filmi AD plakasına sağlam bir şekilde yapıştırmak için kapatıcı film aplikatörünü kullanın.
6. PCR'yi başlatmadan önce tüm sıvının her kuyucuğun tabanında toplandığını onaylayın.

Not: Amplifikasyon ve saptama, çalışma MMX'ine ilk örnek DNA dilüsyonunun eklenmesinden sonraki 1 saat içinde başlatılmalıdır.

PCR'nin başlatılması

EGFR iş akışı adımları hakkında ayrıntılı talimatlar için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın. “Select test” (Test seçin) açılır penceresi açıldığında, “EGFR Tissue P1” (EGFR Doku P1) seçin ve “OK” (Tamam) düğmesine tıklayın.

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması

Not: Tüm çalışma ve örnek doğrulama işlemleri **cobas® 4800** yazılımıyla gerçekleştirilir.

Not: Geçerli bir test çalışması hem geçerli hem de geçersiz örnek sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, örnek sonuçları Tablo 5'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 5 cobas EGFR Test için sonuçların yorumlanması

Test sonucu	Mutasyon Sonucu	Yorum
Mutasyon Saptandı	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Birden fazla mutasyon mevcut olabilir)	Belirtilen hedeflenen EGFR bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptanmadı (NMD)*	Yok	Hedeflenen EGFR bölgelerinde mutasyon saptanmadı
Geçersiz	Yok	Örnek sonucu geçersizdir. Aşağıdaki Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi adlı bölümde yer alan yönergeleri izleyerek geçersiz sonuç içeren örnekleri yeniden test edin.
Başarısız	Yok	Donanım veya yazılım hatası nedeniyle çalışma başarısız oldu. Teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

* “Mutasyon Saptanmadı” sonucu, sonuçların mutant sekanslarının yüzdesine, yeterli örnek bütünlüğüne, inhibitörlerin yokluğuna ve saptanacak yeterli DNA'ya bağlı olmasından ötürü hedeflenen EGFR bölgelerinde bir mutasyonun varlığını engellemez.

Sonuç işaretleri Results (Sonuçlar) sekmesinin (ekranda) veya Flags (İşaretler) sütununun (raporda) altında görülebilir. Daha ayrıntılı bilgi için **Sonuç işaretleri** bölümüne bakın.

Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi

- Amplifikasyon ve saptama** bölümündeki “Örnek DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması” ve “Örnek Dilüsyonu” prosedürlerinden başlayarak geçersiz örnek DNA stokunun dilüsyonunu tekrarlayın.
- DNA stoku dilüsyonunu “Örnek Dilüsyonu” bölümünde açıklandığı gibi 2 ng/μL olarak gerçekleştirdikten sonra “Çalışma master mix'lerinin hazırlanması (MMX-1, MMX-2 ve MMX-3 v2)” ve amplifikasyon ve saptama prosedürünün geri kalanı ile devam edin.

Not: Örnek yeniden test edildikten sonra geçersiz kalırsa veya 1. adımdaki **Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi** sırasında başka bir dilüsyon hazırlamak için yeterli DNA stoku yoksa, yeni bir 5 μm FFPET tümör kesitini kullanarak Parafinden Arındırma ve DNA izolasyonu ile başlayın ve bu örnek için tüm test prosedürünü tekrarlayın.

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği

30 örneğe kadar her bir çalışmaya, çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için bir set **cobas** EGFR Test Mutant Control (EGFR MC) (A01, A02 ve A03 kuyucukları) ve negatif kontrol (NEG) (B01, B02 ve B03 kuyucukları) dahil edilir. Hem EGFR MC hem de NEG geçerli ise çalışma geçerlidir. EGFR MC veya NEG geçersiz ise, tüm çalışma geçersizdir ve tekrar edilmelidir. Amplifikasyon ve saptama için kontroller içeren yeni bir AD plakası oluşturmak üzere önceden izole edilmiş örnek DNA Stokunun yeni bir dilüsyonunu hazırlayın.

Mutant kontrolü

EGFR MC sonucu “Geçerli” olmalıdır. EGFR MC sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Negatif kontrol

NEG sonucu “Geçerli” olmalıdır. NEG sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Prosedür ile ilgili sınırlamalar

1. Yalnızca belirtilen örnek tiplerini test edin. **cobas** EGFR Test, KHDAC FFPET tümör örnekleriyle kullanım için doğrulanmıştır.
2. **cobas** EGFR Test, yalnızca **cobas**® DNA Sample Preparation Kit kullanılarak doğrulanmıştır (Roche P/N: 05985536190).
3. Bir mutasyonun saptanması örnekte mevcut olan kopya sayısına bağlıdır ve örneğin bütünlüğünden, izole edilen DNA konsantrasyonundan ve etkileşimde bulunan maddelerin varlığından etkilenebilir.
4. Alınan sonuçların güvenilir olması, gerekli ve yeterli örnek fiksasyonu, taşıma, depolama ve işlem koşullarına bağlıdır. **cobas**® DNA Sample Preparation Kit Kullanım Talimatları (M/N 05985536190), bu Kullanım Talimatları ve **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzu veya **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı içindeki prosedürleri takip edin.
5. Örneğin fiksasyon değişkenleri gibi diğer potansiyel değişkenlerin etkileri değerlendirilmemiştir.
6. AmpErase enziminin **cobas** EGFR Test Master Mix'e eklenmesi, hedef DNA'nın selektif amplifikasyonunu sağlar; ancak iyi laboratuvar uygulamaları ve bu Kullanım Talimatları'nda belirtilen prosedürlere tam uyum, reaktiflerde kontaminasyondan kaçınmak için gereklidir.
7. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas**® 4800 Sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanmalıdır.
8. Sadece **cobas**® z 480 analizörünün bu ürünle kullanılması onaylanmıştır. Başka gerçek zamanlı optik saptama sistemi olan hiçbir termal döngüleyici bu ürünle kullanılamaz.
9. Teknolojiler arasındaki içsel farklılıklardan ötürü, bir teknolojiye geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını değerlendirmek için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları önerilir.
10. PCR inhibitörlerinin varlığı sonuçların yanlış negatif veya geçersiz olmasına yol açabilir.
11. Nadir olmakla birlikte **cobas** EGFR Test'te kullanılan primerler veya probalar tarafından kapsanan EGFR geninin genomik DNA bölgelerindeki mutasyonlar, 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarında mutasyon varlığının saptanamamasına neden olabilir (“Mutasyon Saptanmadı” sonuçları).
12. **cobas** EGFR Test, TKI tedavisine direnç gösterebilen nadir bir edinilmiş mutasyon olan ekzon 19 L747S mutasyonuna çapraz reaktivite (“Mutasyon Saptandı” sonuçları) gösterir.¹⁹

13. **cobas** EGFR Test'in, reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng DNA ile kullanımı doğrulanmıştır. Reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng'den daha az DNA girdi miktarları önerilmez.
14. **cobas** EGFR Test, kalitatif bir testtir. Test, mutasyon yüzdesinin kantitatif ölçümleri için değildir.
15. Bozulmuş DNA içeren KHDAK FFPET örnekleri, testin EGFR mutasyonlarını saptama yeteneğini etkileyebilir.
16. “Mutasyon Saptanmadı” olarak raporlanan sonuçlara sahip örnekler, test tarafından saptanmayan EGFR mutasyonlarını içerebilir.
17. **cobas** EGFR Test, tümörlerinde ekzon 18 (G719X) yer değiştirmeleri, ekzon 19 delesyonları, ekzon 20 eklemeleri ve yer değiştirmeleri (T790M, S768I) ve ekzon 21 yer değiştirmeleri (L858R, L861Q) olan ancak başka EGFR mutasyonu olmayan KHDAK hastalarında EGFR mutasyonlarını saptar.

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Not: Aşağıdaki çalışma açıklamaları, **cobas** EGFR Test v1 ve v2 ile gerçekleştirilen kümülatif verileri içerir.

Aşağıda açıklanan klinik dışı çalışmalar için, tümör yüzdesi patoloji incelemesi ile değerlendirilmiştir. Test edilecek örnekleri seçmek için çift yönlü Sanger sekanslaması ve yeni nesil sekanslama (NGS) kullanılmıştır. KHDAK FFPET örneğinin mutasyon yüzdesi, bir NGS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Analitik hassasiyet – boş sınırı

Bir şablon olmadığında **cobas** EGFR Test'in performansını değerlendirmek ve bir boş örneğin düşük bir mutasyon konsantrasyonuna işaret edebilecek analitik sinyal oluşturmadığından emin olmak için şablonsuz örnekler ve KHDAK FFPET EGFR yabanıl tip örnekler değerlendirilmiştir. CLSI EP17-A2 kılavuzunda açıklanan analiz kullanılarak²⁰ Boş Sınırı, tüm mutasyonlar için sıfır olarak saptanmıştır.

FFPET örnek karışımlarını kullanarak Saptama Limiti

Ekzon 19 delesyon mutasyonları için üç FFPET örneği DNA ekstraktı, L858R mutasyonu için dört FFPET örneği DNA ekstraktı, L858R ve T790M mutasyonları için iki çift mutant FFPET örneği DNA ekstraktı, G719A mutasyonu için iki FFPET örneği DNA ekstraktı, ikili mutant FFPET örneği T790M ve G719A için DNA ekstraktı, G719C ve S768I mutasyonu için çift mutant FFPET örneği DNA ekstraktı, S768I ve G719S için bir çift mutant FFPET örneği DNA ekstraktı, ekzon 20 ekleme mutasyonu için üç FFPET örneği DNA ekstraktı ve L861Q mutasyonu için üç FFPET örneği DNA ekstraktı, ekzon 18, 19, 20 ve 21'de EGFR mutasyonlarını saptamak için kullanımı doğrulanmış yeni nesil sekanslama yöntemi (NGS) ile %10, 5,0, 2,5 ve 1,25 mutasyon seviyesini hedefleyen örneklerle karışımlar elde etmek için EGFR yabanıl tip FFPET örnek ekstraktları ile karıştırılmıştır. Her örnek karışımın seri dilüsyonları hazırlanmıştır ve her bir panel ögesinin sekiz kopyası, üç **cobas** EGFR Test kit lotunun (n = 24/panel ögesi) her biri kullanılarak çalıştırılmıştır. Her örneğin saptama limiti, Tablo 6 içinde gösterildiği şekilde hedeflenen mutasyon için en az %95'lik bir EGFR “Mutasyon Saptandı” oranı veren en düşük DNA miktarı ile belirlenmiştir.

Tablo 6 FFPET örnek karışımlarını kullanarak cobas EGFR Test'in saptama limiti

EGFR Ekzonu	EGFR Mutasyon Grubu	EGFR Nükleik Asit Sekansı	Reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng DNA girdisi ile $\geq$ %95 "Mutasyon Saptandı" Oranı elde etmek için Panel Ögesindeki Mutasyon Yüzdesi (N = 24 kopya)	COSMIC ID 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	Ekzon 19 Delesyon	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
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
	Ekzon 20 Ekleme	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

* EURTAC kohortunda bulunan baskın olmayan ekzon 19 delesyon mutasyonları için yalnızca yaklaşık %5 mutasyonu hedefleyen tek bir seviye test edilmiştir. Örnek DNA karışımları, 3 çalışma merkezinde test edilmiştir.

** Bu mutasyon için **cobas** EGFR Test'in Saptama Limiti, reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng'lik standart girdi kullanıldığında %10 mutasyon seviyesinden fazladır.

Bu çalışma, **cobas** EGFR Test'in, reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng'lik standart girdiyi kullanarak en az %5 mutasyon seviyesi ile EGFR ekzonları 18, 19, 20 ve 21'deki mutasyonları saptayabildiğini göstermektedir.

Minimum tümör içeriği

Tümör içeriği %25 ila %99 arasında değişen toplam 66 bağımsız EGFR mutant örneği (35 ekzon 19 delesyon mutanı ve 31 ekzon 21 L858R mutanı), KHDAC örneklerinde EGFR mutasyonunu saptamak için gereken minimum tümör içeriğini belirlemek için test edilmiştir. Değerlendirilen örneklerin hiçbirinde hem ekzon 19 delesyon mutasyonu hem de ekzon 21 L858R mutasyonu yoktur. Her örnek makrodiseksiyon (saf) olmadan ve makrodiseksiyondan sonra test edilmiştir. Temiz ve makrodiseke edilmiş slaytlar için gözlemlenen CtR değerleri, Deming regresyonu ve Bland-Altman grafiği (farklara karşı ortalama) kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, makrodiseksiyon olmadan tümör içeriği %25'ten fazla olan örneklerin kullanımını desteklemektedir.

İlave 10 EGFR yabanıl tip KHDAC örneği (%1–90 tümör içeriği) ve 10 EGFR mutant örneği (%8–95 tümör içeriği), düşük yüzde tümörlü KHDAC tümör dokusunun makrodiseksiyonunun cobas EGFR Test'in saptama kapasitesini iyileştirip iyileştirmeyeceğini belirlemek için test edilmiştir. Her örnek makrodiseksiyon (saf) olmadan ve makrodiseksiyondan sonra test edilmiştir. Tüm makrodiseke edilmiş sonuçlar, makrodiseke edilmemiş tüm sonuçlarla eşleşmiştir ve 20 örneğin tümü için beklenen mutasyon ve yabanıl tip sonuçları gözlemlenmiştir.

Erlotinib ile sisplatin bazlı kemoterapinin karşılaştırıldığı Faz III EORTC çalışmasında, %10'dan az tümör içeriğine sahip KHDAC FFPET örnekleri, EGFR mutasyon analizinden önce makrodiseke edilmiştir. EORTC tarafından taranan örneklerin bir alt kümesi, hem cobas EGFR Test hem de yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemleriyle EGFR mutasyon durumu açısından değerlendirilmiştir. Tablo 7 ve Tablo 8 hem cobas EGFR Test hem de NGS sekanslamasından birleştirilen EGFR ekzon 19 veya L858R mutasyonlarının geçerli eşleştirilmiş sonuçlarına sahip KHDAC örneklerini içerir. NGS'yi referans yöntemi olarak kullanan sonuçlar, %10'dan az tümör içeriğine sahip KHDAC FFPET kesitlerinin makrodiseksiyonunun, makrodiseksiyonsuz KHDAC FFPET kesitiyle benzer analitik doğruluk gösterdiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmalar, cobas EGFR Test ile test edilmeden önce %10'dan az tümör içeriğine sahip KHDAC FFPET kesitleri için makrodiseksiyonun gerekli olduğunu desteklemektedir.

Tablo 7 Tümör içeriği ≤ %10 olan KHDAC FFPET örnekleri için cobas EGFR Test performansı (makrodiseke)

Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%97,2 (35/36)	%85,8, %99,5
Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%94,5 (52/55)	%85,1, %98,1
Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%95,6 (87/91)	%89,2, %98,3

Tablo 8 Tümör içeriği > %10 olan KHDAC FFPET örnekleri için cobas EGFR Test performansı (makrodiseke edilmemiş)

Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%93,0 (107/115)	%86,9, %96,4
Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%98,5 (199/202)	%95,7, %99,5
Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%96,5 (306/317)	%93,9, %98,1

Diğer ekzon 18, 19, 20 ve 21 mutasyonları için çapraz reaktivite

EURTAC klinik araştırma örnekleri

cobas EGFR Test, EURTAC klinik araştırma örneklerinde gözlemlenen aşağıdaki EGFR mutasyonları için “Mutasyon Saptandı” sonuçlarını vermiştir (Tablo 9). cobas EGFR Test'in bu mutasyonları saptamasındaki analitik performansı değerlendirilmemiştir.

Tablo 9 cobas EGFR Test ile çapraz reaksiyonda olduğu saptanan EURTAC kohortunda gözlemlenen mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Bulunamadı
	2236_2244del9	E746_R748>E	Bulunamadı
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Bulunamadı
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Bulunamadı

AURA2 klinik araştırma örnekleri

cobas EGFR Test, AURA2 klinik araştırma örneklerinde gözlemlenen aşağıdaki EGFR mutasyonu için “Mutasyon Saptandı” sonucunu vermiştir (Tablo 10). cobas EGFR Test'in bu mutasyonu saptamasındaki analitik performansı değerlendirilmemiştir.

Tablo 10 cobas EGFR Test ile çapraz reaksiyonda olduğu saptanan AURA2 çalışmasında gözlemlenen mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Özgüllük – mikroorganizmalar ve EGFR homologları

Akciğerle ilişkili mikroorganizmalar ve EGFR homologlarının plazmidleri, yani, cobas EGFR Test ile amplifikasyona uğrayan EGFR 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarındaki sekanslara benzer şekilde HER2, HER3 ve HER4 genetik bölgelerinin her birinden gelen sekansları içeren plazmidler test edilerek cobas EGFR Test'in özgüllüğü değerlendirilmiştir.

Akciğerle ilişkili mikroorganizmalar

4×10^5 koloni oluşturabilen birimlerde *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*'nin, doku lizisi adımı sırasında yabancı tip ve mutant EGFR sekanslarını içeren örneklerle eklendiğinde cobas EGFR Test ile çapraz reaksiyona girmedikleri veya etkileşimde bulunmadıkları görülmüştür.

EGFR homologlarının plazmidleri

Yapısal olarak ilişkili epidermal reseptör tirozin kinaz protein analog sekansları (EGFR/HER1, HER2, HER3 ve HER4) amplifikasyon/saptama prosedüründen önce izole edilmiş DNA stokuna 50 ng/PCR girdisine eşdeğer bir genomik kopya numarasında potansiyel çapraz reaktif sekans eklendiğinde cobas EGFR Test ile çapraz reaksiyona girmedikleri gösterilmiştir. Plazmid DNA'nın olmadığı bir kontrol durumu dahil edilmiştir. Sonuçlar, test edilen 15 FFPET örneğinin tümü için gözlemlenen mutasyonların, eklenen HER gen plazmid DNA'sının varlığında ve yokluğunda sekanslama ile belirlenen şekilde beklenen mutasyonla eşleştiğini göstermiştir. Ek olarak, EGFR ekzon 19 mutasyonu L747S, çapraz reaktivite için test edilmiştir. Sonuçlar, cobas EGFR Test'in EGFR ekzon 19 mutasyonu L747S ile çapraz reaksiyona girdiğini göstermiştir.

İnterferans

Trigliseritler (37 mM, CLSI önerilen yüksek konsantrasyon²¹) ve hemoglobine (2 mg/mL, CLSI önerilen yüksek konsantrasyon²¹), örnek hazırlama prosedürü sırasında lizis adımına potansiyel etkileşimde bulunan madde eklendiğinde **cobas** EGFR Test ile etkileşime girmediği gösterilmiştir.

Örnek hazırlama prosedürü sırasında lizis adımına Albuterol (Ventolin), Ipratropium (Atrovent), Flutikazon (Flonaz), Seftazidim (Fortaz), Imipenem-silastin (Primaksin), Piperazilin-tazobaktam, Cilastin (Silastatin sodyum), Betadin ve Lidokain eklendiğinde **cobas** EGFR Test'in performansını etkilemediği gösterilmiştir.

Nekrotik doku

EGFR mutantı için %60'a kadar ve yabancı tip örneklerde %85'e kadar nekrotik doku içeriğine sahip KHDAC FFPET örneklerinin, **cobas** EGFR Test kullanılarak sonuçları etkilemediği gösterilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

cobas EGFR Test'in tekrarlanabilirliği, aşağıdakiler dahil olmak üzere altı FFPET örneği kullanılarak değerlendirilmiştir: iki yabancı tip EGFR örneği; dört mutant EGFR örneği ve aşağıdakilerden birer adet: ekzon 19 delesyonu, S768I ve G719X, T790M ve L858R ve ekzon 20 ekleme mutasyonları. Bu örnekler, dört gün boyunca iki farklı reaktif lotu ve iki **cobas**® z 480 analizörü kullanılarak iki operatör tarafından iki kopya halinde test edilmiştir. Örnek başına toplam 32 kopya değerlendirilmiştir. **cobas** EGFR Test, %96,9 (186/192) doğru karar oranına sahiptir.

cobas EGFR Test'in tekrarlanabilirliği, aşağıdakiler dahil olmak üzere dört FFPET örneğinin kullanıldığı ikinci bir çalışmada da değerlendirilmiştir: bir yabancı tip EGFR örneği; üç mutant EGFR FFPET örneği ve aşağıdakilerden birer adet: L861Q, G719X ve ekzon 20 ekleme mutasyonları. Örnekler, birden fazla gün boyunca iki farklı reaktif lotu ve iki **cobas**® z 480 analizörü kullanılarak iki operatör tarafından iki kopya halinde test edilmiştir. **cobas** EGFR Test, tüm örnek kopyalarında, operatörlerde, reaktif lotlarında ve kombine cihazlarda %99,2 (127/128) karar doğruluğuna sahiptir.

Örnek işlemenin tekrar üretilebilirliği

cobas® DNA Sample Preparation Kit'in tekrar üretilebilirliği, biri ekzon 19 delesyon mutasyonu, biri L858R mutasyonu ve biri de yabancı tip olmak üzere üç FFPET örnek bloğundan alınan kesitler kullanılarak incelenmiştir. Her örnek, her bir gün her bir merkezde iki kopya halinde test edilmiştir. Belirli bir örnek için örnek kesitleri randomize edilmiştir ve her merkezde bir operatör, her merkezde bir **cobas**® z 480 analizörü, üç **cobas**® DNA Sample Preparation Kit lotu ve bir **cobas** EGFR Test kiti kullanılarak üç merkezde altı gün boyunca test edilmiştir. Her test gününde, her operatör **cobas** EGFR Test'i kullanarak her örnek için iki KHDAC FFPET curl kesitinden DNA'yı izole ederek test etmiştir. Altı günlük testler boyunca tüm örneklerde geçerli ve doğru sonuçlar raporlanmıştır. Tüm kombine örnekler ve operatörler için **cobas** EGFR Test, %100 (108/108) doğru karar oranına sahiptir.

Klinik performans değerlendirmesi

Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması 1

cobas EGFR Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 3 harici test merkezinde (merkez başına 2 operatör), 3 reaktif lotu ve 5 ardışık olmayan test gününde KHDAK yabancı tip (WT) ve Mutant tip (MT) tümör örneklerinin FFPE kesitlerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinden oluşan 13 ögeli bir panel ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu panel, ekzon 21'deki L858R mutasyonunu ve beş farklı ekzon 19 delesyon mutasyonunu içermiştir. 92 çalışmadan 90'ı (%97,8) geçerlidir. Geçerli olan 90 çalışmada 13 panel ögesi üzerinde toplam 2340 test gerçekleştirilmiştir ve tüm test sonuçları geçerlidir. WT panel ögelerinin geçerli 180 testinde "Mutasyon Saptandı" sonucu bulunmamıştır ve %100 uyum sağlanmıştır. 12 MT panel ögesinin 10'u için %100 uyum sağlanmıştır. EX19_2240_2257del18 – %5 Mutasyon panel ögesi için uyum %62,8'dir (180 test sonucunun 67'sinde Mutasyon Saptanmadı). EX19_2240_2257del18 – %10 Mutasyon panel ögesi için uyum %99,4'tür (180 test sonucunun 1'inde Mutasyon Saptanmadı). Genel uyuma göre sonuçlar Tablo 11 içinde gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı (CV), tüm mutasyon panel ögelerinde < %6'dır. Her panel ögesi içinde CV < %3,5'tur. Harici kontrol için genel CV, < %1,3'tür. CV, lotlar arası < %0,5 ve lot içi < %1,2'dir.

Tablo 11 cobas EGFR Test tekrar üretilebilirlik çalışması 1'de panel ögesine göre genel uyum tahminleri

Panel Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum (N)	Uyum % (%95 GA) ^a
Yabancı tip	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – %5 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – ≤ %10 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – %5 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – ≤ %10 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – %5 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – ≤ %10 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15-%5 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – ≤ %10 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 – %5 Mutasyon	180	113	62,8 (55,3, 69,9)*
EX19_2240_2257del18 – ≤ %10 Mutasyon	180	179	99,4 (96,9, 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R – %5 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R – ≤ %10 Mutasyon	180	180	100 (98,0, 100,0)

Not: Sonuçlar, bir MT panel ögesi geçerli bir "Mutasyon Saptandı" sonucuna sahip olduğunda veya Yabancı tip panel ögesi geçerli bir Mutasyon Saptanmadı sonucuna sahip olduğunda uyumludur.

^a %95 GA = %95 kesin binom güven aralığı.

* Bu mutasyonun saptanması için **cobas** EGFR Test'in analitik hassasiyeti, reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng'lik standart girdi kullanıldığında %10 mutasyon seviyesinden fazladır.

Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması 2

cobas EGFR Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 3 test merkezinde (2 harici ve 1 dahili, merkez başına 2 operatör), 3 reaktif lotu ve 5 ardışık olmayan test gününde KHD AK WT ve mutant tümör örneklerinin FFPE kesitlerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinden oluşan 11 ögeli bir panel ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu panel, ekzon 18 G719X mutasyonunu, ekzon 20 T790M mutasyonunu, ekzon 20 S768I mutasyonunu, ekzon 20 ekleme mutasyonunu ve ekzon 21 L861Q mutasyonunu içerir. 91 çalışmadan 90'ı (%98,9) geçerlidir. 90 geçerli çalışmada iki kez test edilen 11 panel ögesi ile toplam 1980 test gerçekleştirilmiştir; tüm test sonuçları geçerlidir. WT panel ögelerinin geçerli 180 testinde “Mutasyon Saptandı” sonucu bulunmamıştır ve %100 uyum sağlanmıştır. Ekzon 20 ekleme LoD paneli ögesi hariç tüm mutant panel ögeleri için uyum %100'dür. Genel uyuma göre sonuçlar, aşağıda Tablo 12 içinde gösterilmiştir. CV, tüm mutant panel ögelerinde < %9,2'dir. Harici kontrol için genel CV, ≤ %1,3'tür. %CV, lotlar arası için ≤ %0,6 ve lot içi için ≤ %1,1'dir.

Tablo 12 cobas EGFR Test tekrar üretilebilirlik çalışması 2'de panel ögesine göre genel uyum tahminleri

Panel Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum (N)	Uyum % (%95 GA)*
Yabanıl tip	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 18 G719X – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 T790M – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 S768I – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme – LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
Ekzon 21 L861Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 18 G719X – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 S768I – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 L861Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Not: Mutant Tipi bir panel ögesi, hedef mutasyon için saptanan geçerli bir mutasyon sonucuna sahip olduğunda veya yabanıl tip bir panel ögesi, geçerli bir NMD sonucuna sahip olduğunda sonuçlar uyumludur.

* %95 GA = %95 kesin binom güven aralığı.

GA = güven aralığı; LoD = saptama limiti; NMD = Mutasyon Saptanmadı.

EURTAC çalışmasından Faz III örneklerini kullanarak referans yönteme korelasyon

cobas EGFR Test'in klinik performansı, TARCEVA® (erlotinib) ile sisplatin bazlı kemoterapinin Faz III EURTAC çalışmasında taranan ileri evre KHDAK hastalarından alınan 487 formalinle fikse edilmiş parafin bloklarda saklanan akciğer tümörü örneği kullanılarak iki referans yöntemle ($2 \times$ çift yönlü Sanger sekanslaması ve kantitatif yeni nesil sekanslama (NGS)) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.^{6,22} Bu retrospektif test için örnekleri mevcut olan hastaların klinik ve demografik özellikleri, örneklerin tekrar test edilmesi için mevcut olmayan diğer uygun hastaların (557) özellikleriyle benzerdir.

Toplamda 1276 hasta, toplu olarak klinik çalışma testi (CTA) olarak adlandırılan, laboratuvarında geliştirilmiş testlerin bir kombinasyonu kullanılarak EURTAC çalışması için taranmıştır. Uygun olmayan hastalar ve CTA sonuçları olmayanlar hariç tutulduktan sonra bu çalışma için 1044 hasta potansiyel olarak uygun bulunmuştur. 1044 uygun hasta arasında, 225 hastada CTA ile mutasyon pozitif numuneler, 792 hastada CTA ile WT olan numuneler ve 27 hastada CTA ile sonuçsuz kalan örnekler vardır. Potansiyel olarak uygun olan 1044 hastadan, **cobas** EGFR Test ile tekrar test için 487 örnek mevcuttur.

487 örneğin tamamı hem **cobas** EGFR Test hem de Sanger sekanslaması ile kör bir şekilde test edilmiştir. Bunlardan 406'sı hem **cobas** EGFR Test hem de Sanger sekanslaması ile geçerli sonuçlara sahiptir, 38'i **cobas** EGFR Test ve Sanger sekanslaması tarafından geçersiz sonuç, yalnızca Sanger sekanslaması ile 38 geçersiz sonuç ve yalnızca **cobas** EGFR Test ile 5 geçersiz sonuç gözlemlenmiştir. **cobas** EGFR Test ile tekrar test edilebilecek 487 örnek arasından 444 örnek, geçerli **cobas** EGFR Test sonuçları vermiştir ve ayrıca NGS ile test edilmiştir. Bunlardan NGS tarafından 36 geçersiz sonuç vardır; dolayısıyla 408'i, hem **cobas** EGFR Test hem de NGS tarafından geçerli sonuçlara sahiptir. Her referans yöntem ile karşılaştırılan **cobas** EGFR Test'in analitik doğruluğu, pozitif uyum yüzdesi (PPA), negatif uyum yüzdesi (NPA) ve genel uyum yüzdesi (OPA) ve ekzon 19 delesyonları ve L858R mutasyonları için bunlara karşılık gelen %95 GA'lar toplu olarak ve ayrı ayrı tahmin edilerek değerlendirilmiştir.

EURTAC kohortunda, Tablo 13 içinde listelenen şekilde, **cobas** EGFR Test, EGFR geninin 19 ekzonunda ve 21 ekzonunda mutasyonlar saptamıştır. EURTAC kohortunda saptanan mutasyonlarda analitik hassasiyet, Tablo 6 içinde listelenen mutasyonlarda gösterilmiştir.

Tablo 13 EURTAC kohortunda cobas EGFR Test ile saptanan mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID 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	Bulunamadı
	2236_2244del9	E746_R748>E	Bulunamadı
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Bulunamadı
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Bulunamadı
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Bulunamadı
21	2573 T>G	L858R	6224

Geçerli **cobas** EGFR Test ve Sanger sonuçlarına sahip toplam 406 örnek uyum analizine dahil edilmiştir. Tablo 14 içinde gösterildiği gibi toplu olarak ekzon 19 delesyonlarının ve L858R mutasyonlarının saptanmasında **cobas** EGFR Test ile Sanger sekanslaması arasındaki PPA %96,6'dır (%95 GA: %91,5–98,7) ve NPA %88,3'tür (%95 GA: %84,1–91,5). OPA %90,6'dır ve %95 GA'nın alt limiti ise %87'nin üzerindedir. Ekzon 19 delesyon mutasyonlarının saptanmasında PPA, NPA ve OPA'nın tümü > %92'dir. L858R mutasyonlarının saptanmasında PPA, NPA ve OPA'nın tümü > %95'tir.

Tablo 14 EGFR ekzon 19 delesyon mutasyonları ve L858R mutasyonunun saptanması için cobas EGFR Test'in Sanger sekanslaması ile karşılaştırılması

Mutasyon	Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Ekzon 19 Delesyon	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%97,3 (71/73)	%90,5, %99,2
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%92,5 (308/333)	%89,2, %94,9
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%93,3 (379/406)	%90,5, %95,4
L858R	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%95,3 (41/43)	%84,5, %98,7
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%97,5 (354/363)	%95,4, %98,7
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%97,3 (395/406)	%95,2, %98,5
Toplu halde	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%96,6 (112/116)	%91,5, %98,7
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%88,3 (256/290)	%84,1, %91,5
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%90,6 (368/406)	%87,4, %93,1

Geçerli **cobas** EGFR Test ve NGS sonuçlarına sahip toplam 408 örnek uyum analizine dahil edilmiştir. Karşılaştırma yaparak ekzon 19 delesyonları ve agregadaki L858R nokta mutasyonunun saptanması için **cobas** EGFR Test ile NGS arasında PPA ve NPA, Tablo 15 içinde gösterildiği gibi sırasıyla %94,0 (%95 GA: %89,1–96,8) ve %97,7'dir (%95 GA: %95,0–98,9). OPA %96,3'tür ve %95 GA'nın alt limiti ise %94,0'tür. Ekzon 19 delesyon mutasyonlarının saptanmasında PPA, NPA ve OPA'nın tümü > %95'tir ve %95'lik alt limit GA'larının tümü > %90'dır. L858R mutasyonunun saptanmasında PPA, NPA ve OPA'nın tümü > %95'tir ve saptanan az sayıda L858R mutasyonundan ötürü PPA (%90) dışında $\geq$ %95 GA'ların tüm alt limitleri %95'tir.

Tablo 15 EGFR ekzon 19 delesyon mutasyonları ve L858R mutasyonunun saptanması için cobas EGFR Test'in NGS ile karşılaştırılması

Mutasyon	Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Ekzon 19 Delesyon	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%95,9 (94/98)	%90,0, %98,4
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%99,7 (309/310)	%98,2, %99,9
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%98,8 (403/408)	%97,2, %99,5
L858R	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%90,6 (48/53)	%79,7, %95,9
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%98,6 (350/355)	%96,7, %99,4
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%97,5 (398/408)	%95,5, %98,7
Toplu halde	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%94,0 (142/151)	%89,1, %96,8
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%97,7 (251/257)	%95,0, %98,9
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%96,3 (393/408)	%94,0, %97,8

AURA2 çalışmasından Faz II örneklerini kullanarak referans yöntemle korelasyon

cobas EGFR Test'in klinik performansı, TAGRISSO® (osimertinib) Faz II AURA2 çalışmasında **cobas** EGFR Test kullanılarak taranan ileri evre KHDAK hastalarından alınan 383 adet formalinle fikse edilmiş parafin blokta akciğer tümörü örnekleri kullanılarak doğrulanmış bir yeni nesil sekanslama (NGS) platformuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

AURA2 çalışması için toplam 472 hasta **cobas** EGFR Test kullanılarak taranmıştır. Uygun olmayan hastalar hariç tutulduktan sonra bu çalışma için 383 hasta uygun bulunmuştur.

383 örneğin tamamı hem **cobas** EGFR Test hem de doğrulanmış NGS yöntemi ile kör bir şekilde test edilmiştir. Bunlardan 368'i, hem **cobas** EGFR Test hem de NGS tarafından geçerli sonuçlara sahiptir. Hem **cobas** EGFR Test hem de NGS tarafından toplam 2 geçersiz sonuç, yalnızca NGS tarafından 2 geçersiz sonuç ve yalnızca **cobas** EGFR Test ile 11 geçersiz sonuç gözlemlenmiştir. T790M mutasyonunun saptanması için referans yöntem, NGS ile karşılaştırılan **cobas** EGFR Test'in analitik doğruluğu, pozitif uyum yüzdesi (PPA), negatif uyum yüzdesi (NPA) ve genel uyum yüzdesi (OPA) ve T790M mutasyonu için karşılık gelen %95 GA'ları tahmin edilerek değerlendirilmiştir.

AURA2 çalışmasında **cobas** EGFR Test, Tablo 16 içinde listelenen EGFR geninin mutasyonlarını saptamıştır. AURA2 çalışmasında saptanan mutasyonlarda analitik hassasiyet, Tablo 6 içinde listelenen mutasyonlarda gösterilmiştir.

Tablo 16 AURA2 kohortunda cobas EGFR Test ile saptanan mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID 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

Geçerli **cobas** EGFR Test ve NGS sonuçlarına sahip toplam 368 örnek uyum analizine dahil edilmiştir. Tablo 17 içinde gösterildiği şekilde T790M mutasyonunun saptanması için **cobas** EGFR Test ve NGS arasında PPA %88,3 (%95 GA: %83,8–91,7), NPA %97,3 (%95 GA: %92,4–99,1) ve OPA %91,0'dır (%95 GA: %87,7–93,5). Otuz örnek NGS ile pozitif ancak **cobas** EGFR Test ile negatiftir: 10/30 örnekte, NGS tarafından belirlenen T790M mutasyon yüzdesi, **cobas** EGFR Test'in LoD değerinin (< %2 mutasyon) altındadır. 20/30 örnekte, orta derecede gecikmiş bir IC Ct değeri, DNA şablonunun zayıf amplifikasyona uğrayabildiğini göstermiştir.

Tablo 17 EGFR T790M mutasyonunun saptanması için NGS ile cobas EGFR Test'in karşılaştırılması

Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%88,3 (226/256)	%83,8, %91,7
Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%97,3 (109/112)	%92,4, %99,1
Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%91,0 (335/368)	%87,7, %93,5

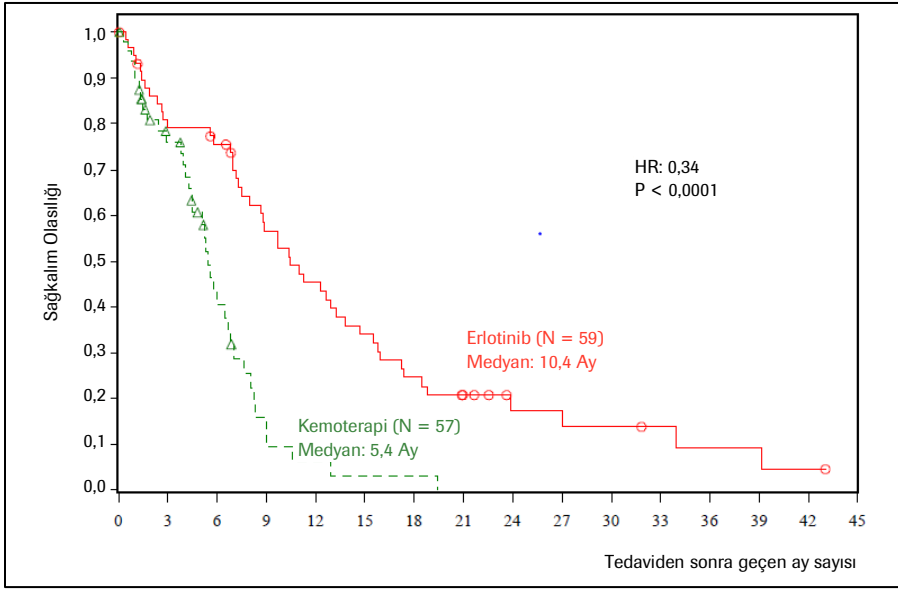
Klinik sonuç verileri

EURTAC

EURTAC çalışması²² TARCEVA® (erlotinib) ile daha önce kemoterapi almamış ve bir klinik araştırma testi (CTA) ile değerlendirilen şekilde tümörlerin EGFR ekzon 19 delesyonları veya ekzon 21 (L858R) yer değiştirme mutasyonlarını içeren ileri evre KHDAK hastalarında birinci basamak tedavi olarak standart platin ikili kemoterapinin karşılaştırıldığı bir Faz III, çok merkezli, açık etiketli, randomize bir çalışmadır. Çalışma, İspanya Akciğer Kanseri Grubu'nun (SLCG) sponsorluğunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya toplam 174 hasta kabul edilmiştir. Çalışma sonuçları, TARCEVA® alan hastaların, 0,34'lük bir tehlike oranıyla, kemoterapi alan hastalara kıyasla ilerlemesiz sağkalımda (PFS) (medyan PFS 10,4 aya karşı 5,1 ay) istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sahip olduğunu göstermiştir ($p < 0,0001$, %95 GA [0,23; 0,49]). TARCEVA® kolundaki hastaların yanıt oranı, kemoterapi ile tedavi edilen hastaların yanıt oranından daha yüksektir (%65,1'e karşı %16,1). Standart kemoterapi kolundaki hastaların %76'sı TARCEVA® almak için çapraz geçiş yaptığından, iki kolda da genel sağkalımda (OS) anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

EURTAC çalışmasına dahil olan 174 hastadan 134 vaka (TARCEVA® kolundan 69 hasta ve kemoterapi kolundan 65 hasta dahil olmak üzere çalışma popülasyonunun %77'si) tekrar test için uygundur ve cobas EGFR Test ile retrospektif olarak test edilmişlerdir. Tekrar test edilen 134 cobas EGFR Test vakasından 116 vakada (TARCEVA® kolundan 59 hasta ve kemoterapi kolundan 57 hasta) cobas EGFR Test tarafından "Mutasyon Saptandı" sonucu bulunmuştur. 116 alt grubun analizi, TARCEVA® ile tedavi edilen hastaların PFS süresinde anlamlı bir artış olduğunu (medyan PFS 10,4'e karşı 5,4 ay) ve kemoterapi ile tedavi edilen hastalara göre ilerleyen hastalık veya ölüm ($HR = 0,34$, %95 GA [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) durumunu yaşama olasılığının daha düşük olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3). TARCEVA® kolundaki yanıt oranı kemoterapi koluna kıyasla daha yüksektir (%59,3'e karşı %14,0). İki grup arasında OS'de anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. cobas EGFR Test ile test edilen hasta alt grubunda gözlemlenen klinik fayda, tüm çalışma popülasyonunda gözlemlenenle benzerdir (Tablo 18).

cobas EGFR Test ile pozitif olarak test edilen ancak CTA tarafından negatif veya geçersiz olarak test edilen hastaları değerlendirmek için ek etkililik analizi yapılmıştır. En kötü durum senaryosunda (cobas EGFR Test ile pozitif ve CTA ile negatif hastalar için tehlike oranının 1 olduğu varsayılarak), veriler 0,42'lik bir tehlike oranı olduğunu göstermiştir (%95 GA [0,26; 0,57]).

Şekil 3 cobas EGFR Test (araştırmacı değerlendirmesi) tarafından mutasyon saptanan hastalar için tedaviye göre PFS'nin Kaplan-Meier grafiği**Tablo 18** cobas EGFR Test ile test edilen hastaların klinik faydası, EURTAC popülasyonunda gözlemlenenle benzerdir

Parametre	cobas EGFR Test Pozitif Popülasyon n = 116		EURTAC n = 173*	
	Kemoterapi n = 57	Erlotinib n = 59	Kemoterapi n = 87	Erlotinib n = 86
PFS				
Medyan (Ay)	5,4	10,4	5,1	10,4
Tehlike Oranı	0,34		0,34	
Tehlike Oranı %95 GA	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
P değeri (log-sıra testi)	< 0,0001		< 0,0001	

* Bir hasta, EURTAC çalışmasının tamamlanmasından sonra onamını geri çektiğinden çalışma n = 173'lük bir veri setine sahiptir.

AURA2

AURA2 çalışması,²³ TAGRISSO®'nun (osimertinib) güvenliliğini ve etkililiğini, onaylı EGFR TKI ajanı ile daha önce tedavi almasının ardından hastalığı ilerlemiş olan ileri evre KHDAK hastalarında ikinci veya ≥ üçüncü basamak tedavi olarak değerlendiren, çok merkezli, açık etiketli, tek kollu bir Faz II çalışmasıdır. Tüm hastaların, **cobas** EGFR Test ile saptanan şekilde T790M mutasyonu pozitif KHDAK'ye sahip olması gerekmektedir. Birincil etkililik sonuç ölçütü, yanıt için değerlendirilebilir olan analiz seti kullanılarak Kör Bağımsız Merkezi İnceleme (BICR) tarafından değerlendirildiği üzere RECIST 1.1'e göre objektif yanıt oranıdır (ORR). ORR, en az 4 hafta sonra doğrulanan tam yanıt (CR) veya kısmi yanıt (PR) için en az 1 ziyaret yanıtı olan hastaların sayısı (%) olarak tanımlanmıştır (CR veya PR'nin en iyi objektif yanıtı [BOR]).

AURA2 çalışması için taranan 472 hastadan 383'ü, **cobas** EGFR Test ile test etmek için uygundur. Uygun olan hastalar arasında 233 T790M+ hastası AURA2 çalışmasına alınmıştır ve 210 hasta kabul edilmiş ve TAGRISSO® almıştır (tam analiz seti [FAS]).

Tablo 19 içinde aşağıda AURA2 içinde BICR ve araştırmacı değerlendirmesi tarafından ORR gösterilmektedir. En az bir doz TAGRISSO® (FAS) alan 210 hastadan 128'i BICR tarafından %61,0'lık bir ORR (%95 GA: %54,0–67,6) ve 135'i araştırmacı değerlendirmesi ile %64,3'lük bir ORR ile doğrulanmış bir yanıt vermiştir (%95 GA: %57,4–70,8).

AURA2 çalışması için uygun olan 383 hastanın tümü, cobas EGFR Test ile tekrar test edilmiştir. AURA 2 çalışmasına kabul edilen 233 pozitif T790M hastasından 225'i, cobas EGFR Test ile T790M+'dır ve 204'ü ise FAS'tadır.

TAGRISSO® (FAS) alan 204 hastadan 127'si BICR tarafından %62,3'lük bir ORR (%95 GA: %55,2–68,9) ve 133'ü araştırmacı değerlendirmesi ile %65,2'lük bir ORR ile doğrulanmış yanıt vermiştir (%95 GA: %58,2–71,7).

Tablo 19 AURA2 çalışmasında cobas EGFR Test ile test edilen T790M+ hastalarının klinik faydası

		AURA2			cobas EGFR Test (IVD) T790M Pozitif		
Analiz Seti	Değerlendiren	N	Doğrulanmış Yanıt Verenlerin Sayısı	ORR (%95 GA)	N	Doğrulanmış Yanıt Verenlerin Sayısı	ORR (%95 GA)
Tam Analiz Seti (FAS)	Kör Bağımsız Merkezi Gözden Geçirme	210	128	%61,0 (%54,0, %67,6)	204	127	%62,3 (%55,2, %68,9)
	Araştırmacı		135	%64,3 (%57,4, %70,8)		133	%65,2 (%58,2, %71,7)

FLAURA

I. TAGRISSO® Birinci Basamak için Faz III Çalışması

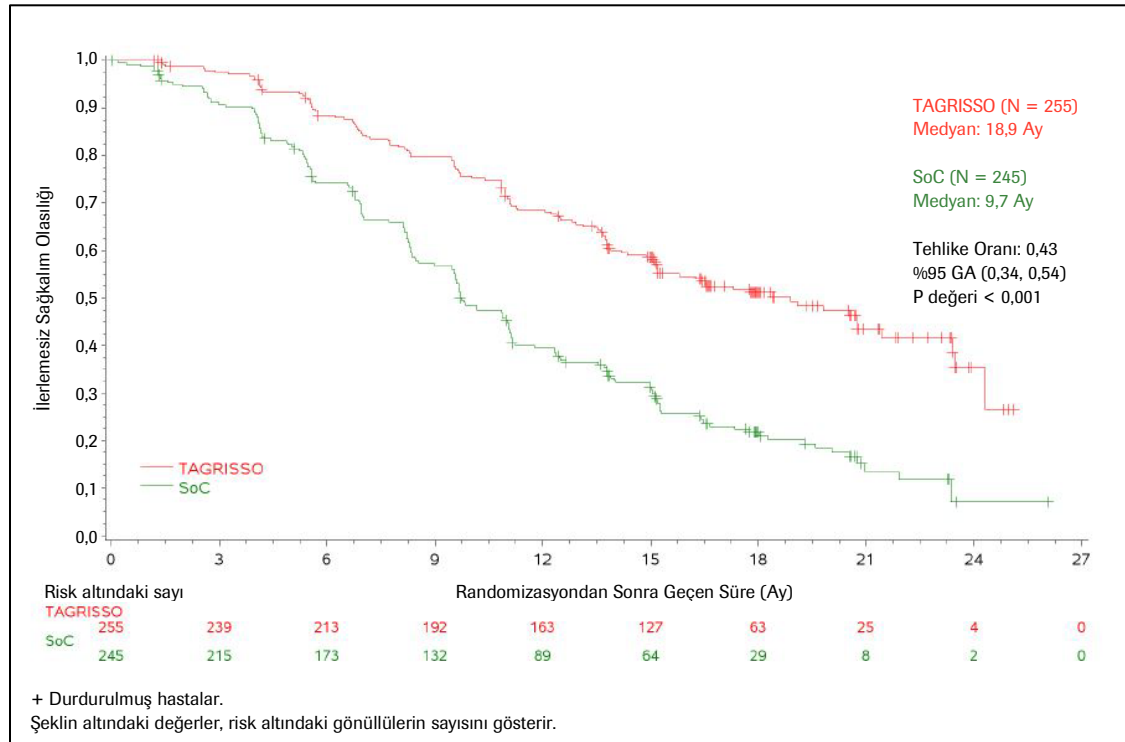
FLAURA çalışması¹⁰ lokal olarak ilerlemiş veya metastatik KHDAK'li, ilerlemiş hastalık için daha önce sistemik tedavi almamış ve tümörleri lokal veya merkezi olarak doğrulanmış EGFR hassaslaştırıcı mutasyonları, birlikte EGFRm pozitif olarak adlandırılan Ex19del veya L858R yer değiştirme mutasyonları olan hastalarda birinci basamak tedavi olarak TAGRISSO®'nun, bakım standardına karşı etkililiğini ve güvenliliğini değerlendirmek için yürütülen Faz III, çift kör, randomize klinik bir çalışmadır (SoC: EGFR-TKI [gefitinib veya erlotinib]). FLAURA çalışmasının birincil uç noktası, tam analiz setindeki (FAS: küresel olarak randomize edilmiş tüm hastalar) hastalar için araştırmacı değerlendirmesine dayanan ilerlemesiz sağkalımdır (PFS).

Çalışmada randomizasyon için toplam 994 hasta taranmış ve bunların 809'unda tümör dokusu örnekleri, tarama sırasında prospektif veya retrospektif olarak merkezi cobas EGFR Test ile test edilmiştir. Randomize 556 hastadan (289'u merkezi cobas doku testine göre ve 267'si yerel bir teste göre randomize edilmiş), 500 hastanın merkezi cobas EGFRm pozitif test sonucuna sahip olduğu doğrulanmıştır. Yerel bir teste dayalı olarak randomize edilen 267 hastadan 211 hastada doğrulanmış bir merkezi cobas EGFRm pozitif test sonucu vardır, 41 hastada örnek olmamasından/yetersiz örnek olmasından ötürü cobas test sonucu yoktur, 9 hastada geçersiz cobas test sonucu vardır ve 6 hastada ise “Mutasyon Saptanmadı” cobas test sonucu vardır.

Tablo 20 içinde aşağıda, tam analiz seti ve birincil cihaz popülasyonu (merkezi cobas doku EGFRm pozitif sonucu olan hastalar) için araştırmacı değerlendirmesine göre PFS için HR gösterilmektedir. Tam analiz seti (N = 556) için araştırmacı değerlendirmesine göre PFS için HR, katmanlı bir log sıralaması testine dayalı olarak 0,46'dır (%95 GA: 0,37, 0,57). Aynı nokta tahmini, ayarlanmamış bir Cox orantılı tehlike modelinden elde edilmiştir. Birincil cihaz popülasyonu (N = 500) için araştırmacı değerlendirmesine göre, ayarlanmamış bir Cox orantılı tehlike modelinden hesaplanan PFS için HR, 0,43'tür (%95 GA: 0,34, 0,54). Birincil cihaz popülasyonunda gözlemlenen klinik etkililik, tam analiz setindeki ile tutarlıdır. Birincil cihaz popülasyonunda araştırmacı değerlendirmesine göre PFS'nin Kaplan-Meier eğrisi, Şekil 4 içinde gösterilmiştir.

Tablo 20 FLAURA tam analiz seti ve birincil cihaz popülasyonu için araştırmacı değerlendirmesiyle ilerlemesiz sağkalım (cobas EGFR Test pozitif)

	FLAURA tam analiz seti N = 556		FLAURA cobas EGFR Test pozitif popülasyonu (Birincil Cihaz Popülasyonu) N = 500	
	Osimertinib (N = 279)	Gefitinib veya Erlotinib (N = 277)	Osimertinib (N = 255)	Gefitinib veya Erlotinib (N = 245)
PFS				
Olay sayısı (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Aylar içinde medyan PFS (%95 GA)	18,9 (15,2, 21,4)	10,2 (9,6, 11,1)	18,9 (15,2, 21,4)	9,7 (9,5, 11,0)
Tehlike Oranı (%95 GA) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
2 taraflı p değeri ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a ayarlanmamış Cox orantılı tehlike modeli**Şekil 4 FLAURA'da cobas EGFR Test (araştırmacı değerlendirmesi) tarafından mutasyon saptanan hastalar için tedaviye göre PFS'nin Kaplan-Meier Grafiği**

II. IRESSA® Bakım Standardı Analizi

FLAURA çalışmasının kontrol kolunda IRESSA® (gefitinib) ile tedavi edilen tEGFR+ hastalarının ayrı bir analizi yapılmıştır. IRESSA® ile tedavi edilen toplam 178 hastadan 174'ünde araştırmacı tarafından değerlendirilen objektif bir yanıt mevcuttur [ORR = %67,8 (118/174, %95 GA: %60,6, %74,3, Tablo 21 içinde POP0)].

IRESSA® ile tedavi edilen ve merkezi bir cobas doku testi (birincil etkililik popülasyonu) ile randomize edilen 79 hastadan 57'sinde %72,2 ORR oranı ile objektif bir yanıt vardır (%95 GA: %61,4, %80,8, Tablo 21 içinde POP1).

IRESSA®'nın cobas doku testine dayalı tedavi etkisi, ORR oranı %64,2 (POP2, kayıtlı yerel test ve ayrıca cobas tEGFR+ hastaları) ile %68,5 (POP3, tüm cobas tEGFR+ hastaları) arasında değişen diğer hasta popülasyonlarında korunmuştur (Tablo 21 ve Şekil 5). Bu sonuçlar, IRESSA® için seçilen hastalar için orijinal kayıt çalışmasında (IFUM) bildirilen sonuçlarla tutarlıdır.¹³

Tablo 21 Dokuda cobas EGFR Test'e dayanan farklı hasta popülasyonları için ORR sonuçları

Objektif Yanıt	SoC Kolunda IRESSA® ile Tedavi Edilen Randomize Hastalar				
	Merkezi Olarak Randomize Edilen (cobas tEGFR+)	Yerel Olarak Randomize Edilen (Yerel tEGFR+)			Toplam
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Geçersiz/Bilinmiyor	
Hasta Sayısı	79	70	2	23	174
Yanıt	57	45	1	15	118
Yanıtsız	22	25	1	8	56
ORR (%, %95 GA)	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)		-	-	-

Not: Eksik objektif yanıtı olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Not: tEGFR = doku EGFR; GA = (skor) Güven Aralığı.

POP = popülasyon (alt grup)

POP1: cobas doku testi ile randomize edilen hastalar için ORR (cobas doku testi için birincil etkililik popülasyonu).

POP2: Yerel doku testi ile randomize edilen hastalar için ORR.

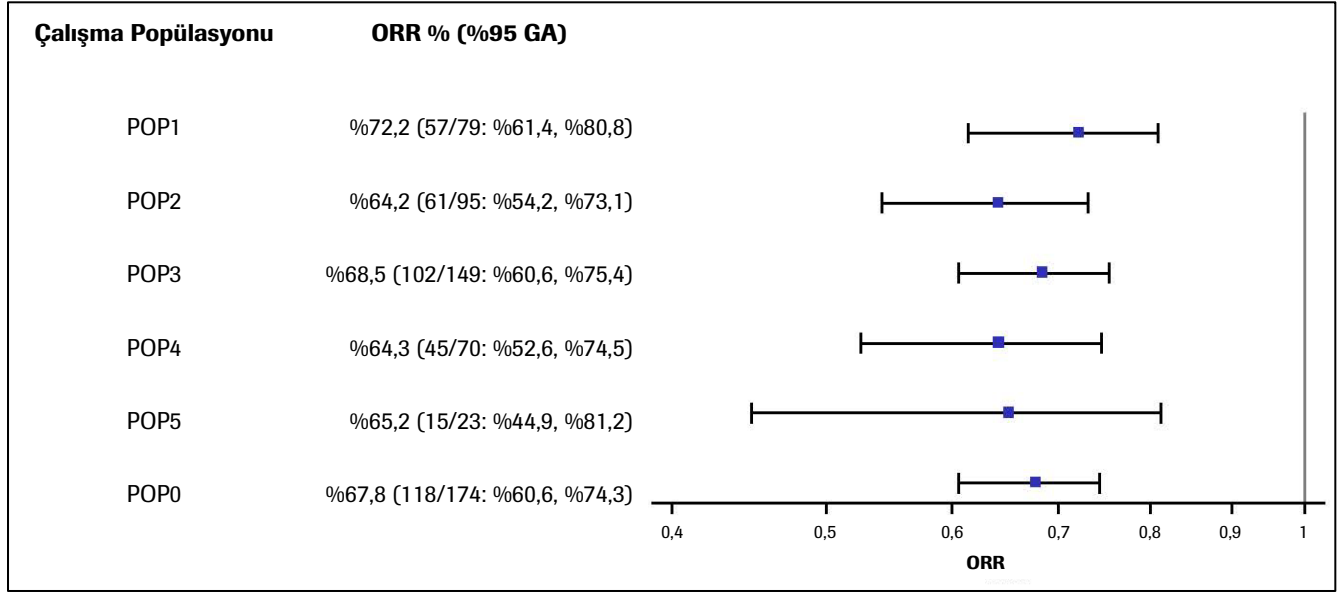
POP3: cobas doku testinde pozitif olan hastalar için ORR.

POP4: Yerel doku testi ile randomize edilen ve cobas doku testi ile doğrulanan hastalar için ORR.

POP5: Yerel doku testi ile randomize edilen ve cobas doku testi geçersiz veya test edilmemiş olan hastalar için ORR.

POP0: IRESSA® ile tedavi edilen tüm hastalar için ORR.

Şekil 5 Farklı popülasyonlar için dokuda cobas EGFR Test'e dayanan ORR'lerin Forest grafikleri



POP = popülasyon (alt grup)

POP1: **cobas** doku testi ile randomize edilen hastalar için ORR (**cobas** doku testi için birincil etkililik popülasyonu).

POP2: Yerel doku testi ile randomize edilen hastalar için ORR.

POP3: **cobas** doku testinde pozitif olan hastalar için ORR.

POP4: Yerel doku testi ile randomize edilen ve **cobas** doku testi ile doğrulanan hastalar için ORR.

POP5: Yerel doku testi ile randomize edilen ve **cobas** doku testi geçersiz veya test edilmemiş olan hastalar için ORR.

POP0: IRESSA® ile tedavi edilen tüm hastalar için ORR.

BÖLÜM B: PLAZMA ÖRNEKLERİYLE KULLANIM İÇİN

Örneğin hazırlanması

Plazma örneklerinden DNA'nın izole edilmesi için cobas® cfDNA Sample Preparation Kit'e (M/N 07247737190) bakın.

Malzemeler ve reaktifler

Sağlanan malzemeler ve reaktifler

Kit/Kasetler	Bileşenler ve Reaktif İçerikleri	Test Başına Kullanılan Miktar	Güvenlik Sembolü ve Uyarı
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 test (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N: 06471366001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N: 06471382001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok

Kit/Kasetler	Bileşenler ve Reaktif İçerikleri	Test Başına Kullanılan Miktar	Güvenlik Sembolü ve Uyarı
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 test (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N: 07248601001) Tris tamponu Potasyum klorür Gliserol EDTA Tween 20 %3,13 dimetil sülfoksit %0,09 sodyum azid < %0,10 dNTPs < %0,01 Z05-AS1 DNA polimeraz (mikrobik) < %0,01 AmpErase (ürasil-N-glikozilaz) enzimi (mikrobik) < %0,01 aptamer < %0,01 yukarı akışlı ve aşağı akışlı EGFR primerleri < %0,01 floresan etiketli EGFR problemleri	2 × 0,48 mL	Yok
	MGAC (Magnezyum asetat) (M/N: 05854326001) Magnezyum asetat %0,09 sodyum azid	6 × 0,2 mL	Yok
	EGFR MC (EGFR Mutant Kontrolü) (M/N: 06471455001) Tris tamponu EDTA Poly rA RNA (sentetik) %0,05 sodyum azid < %0,1 EGFR ekzonu 18, 19, 20 ve 21 sekanslarını içeren plazmid DNA (mikrobik) < %0,1 EGFR yabanıl tip DNA (hücre kültürü)	6 × 0,1 mL	Yok
	DNA SD (DNA Örnek Dilüenti) (M/N: 05854474001) Tris-HCl tamponu %0,09 sodyum azid	2 × 3,5 mL	Yok

Reaktif saklama ve kullanma

Reaktif	Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2°C ila 8°C	Açıldığında 90 gün içindeki 4 kullanıma kadar veya son kullanma tarihine kadar (hangisi önceyse) stabildir.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** ve çalışma MMX (**MGAC**'nin **EGFR MMX-1** veya **EGFR MMX-2** veya **EGFR MMX-3 v2**'ye eklenmesiyle hazırlanır) uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır. Çalışma MMX'i 2°C ila 8°C'de karanlık bir yerde muhafaza edilmelidir. Hazırlanan örnekler ve kontroller, çalışma MMX'i hazırlandıktan sonra 1 saat içinde eklenmelidir. İşlenen örnekler ve kontroller çalışma MMX'ine eklendikten sonra 1 saat içinde amplifikasyon başlatılmalıdır.

Diğer gerekli malzemeler

Malzemeler	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Çamaşır suyu	Herhangi bir satıcı
%70 Etanol	Herhangi bir satıcı
Steril tek kullanımlık, serolojik 5 ve 25 mL'lik pipetler	Herhangi bir satıcı
cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plakası (AD plakası) ve kapatıcı film	Roche 05232724001
cobas® 4800 Sistemi kapatıcı film aplikatörü (cobas® 4800 Sisteminin montajıyla sağlanır)	Roche 04900383001
Ayarlanabilen pipetleyiciler* (5–1000 µL pipetleme yapabilir)	Herhangi bir satıcı
Aerosol bariyer veya pozitif yer değiştirmeli DNase-içermeyen pipet uçları	Herhangi bir satıcı
Tezgah üstü mikrosantrifüj* (20.000 × g kapasiteli)	Eppendorf 5430 veya 5430R veya eşdeğer
-25°C ila -15°C saklama kapasitesi olan dondurucu	Herhangi bir satıcı
Kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL RNase/DNase içermeyen/PCR sınıfı)	Herhangi bir satıcı
Konik ve mikrosantrifüj tüp rakları	Herhangi bir satıcı
Vorteks karıştırıcı*	Herhangi bir satıcı
Tek kullanımlık pudrasız eldivenler	Herhangi bir satıcı

* Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmelidir.

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar

Gerekli cihaz ve yazılımlar, sağlanmamıştır
cobas® z 480 analizör
cobas® 4800 Sistem Kontrol Ünitesi ve Sistem Yazılımı sürümü 2.2 veya üstü
EGFR Plazma P1 Analiz Paketi Yazılım sürümü 1.0 veya üstü*
Barkod Okuyucu uzat. USB
Yazıcı

* Mevcut yazılım sürümü için **cobas®** EGFR Mutation Test v2 kiti Ürün Bilgi Kartına (M/N: 07335873001) bakın.

Ayrı satılan materyallerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar uygulamaları esastır.

- Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.
- Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinizden temin edilebilir.
- Bu test, KHDAK plazma örnekleriyle kullanım içindir. Örnekler, Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyogüvenlik (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*)¹⁶ ve CLSI Belgesi M29-A4'te¹⁷ tanımlanan iyi laboratuvar uygulamaları kullanılarak enfeksiyöz madde gibi değerlendirilmelidir.
- Steril tek kullanımlık pipetlerin ve DNase içermeyen pipet uçlarının kullanılması önerilir.

İyi laboratuvar uygulamaları

- Ağzınızla pipetleme yapmayın.
- Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- Örneklerle ve kit reaktifleriyle işlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu malzemelerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçının. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- Distile veya deiyonize suya %0,5 oranında sodyum hipoklorit ekleyerek taze hazırlayacağınız çözeltiyle laboratuvaradaki tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve dezenfekte edin (ev temizliği için kullanılan çamaşır suyunu 1:10 oranında seyreltin). Bunun ardından %70 etanol içeren çözeltiyle yüzeyi silin.

Not: Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.

Kontaminasyon

- Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı numunelerle ve **cobas** EGFR Test reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir. Numunelerle işlem yaparken kontamine edici eldiven kullanmaktan kaçının.
- Eldivenler, kontaminasyon potansiyelini azaltmak için sık değiştirilmelidir.
- DNA izolasyon alanlarından ayrılmadan önce veya çözeltilerle veya bir örnekle temas edildiğinden şüpheleniliyorsa eldivenler değiştirilmelidir.
- Reaktiflerin mikrobik ve ribonükleaz kontaminasyonundan kaçının.
- Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Her aktiviteye ayrı malzemeler ve ekipmanlar hazırlanmalıdır ve bu malzemeler ve ekipmanlar diğer aktiviteler için kullanılmamalıdır veya alanlar arasında hareket ettirilmemelidir. Örneğin, DNA izolasyonu için kullanılan pipetler ve malzemeler amplifikasyon ve saptama işlemlerine yönelik reaktifleri hazırlamak için kullanılmamalıdır.
- Laboratuvaradaki iş akışının tek yönlü olarak ilerlemesi, bir sonraki aktiviteye geçmeden önce hali hazırda aktivitenin tamamlanması önemle tavsiye edilir. Örneğin, amplifikasyon ve saptama işlemlerine geçmeden önce DNA izolasyonu tamamlanmalıdır. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve saptama işlemleri için kullanılacak alandan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Çalışma master mix'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için çalışma master mix'inin hazırlanması öncesinde amplifikasyon ve saptama çalışma alanı tümüyle temizlenmelidir.

Bütünlük

- Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Farklı kitlerden veya lotlardan alınan reaktifleri birlikte kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

İmha

- DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC ve DNA SD, sodyum azid içerir. Sodyum azid, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azidler oluşturabilir. Laboratuvarındaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azid atılırken, azid birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
- Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.

Dökülme ve temizleme

- cobas® 4800 cihazında dökülme meydana gelirse, temizlemek için uygun cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzu veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı içinde verilen talimatları takip edin.
- cobas® z 480 analizörü temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. cobas® z 480 analizörü, cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzunda veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımı içinde açıklanan prosedürlere göre temizleyin.
- cobas® z 480 analizörünün kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Örnek toplama, taşıma ve saklama

Not: Tüm örnekleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

Örnek toplama ve kullanma

Roche Hücresiz DNA Toplama Tüpü

Roche Hücresiz DNA Toplama Tüplerinde (Roche cfDNA tüpleri) tam kandan toplanan plazma, cobas EGFR Test ile kullanım için doğrulanmıştır.

Plazma, kanın toplanmasından sonra 7 gün içinde Roche cfDNA tüpünde toplanan kandan ayrılmalıdır. Roche cfDNA tüpünde toplanan kan örnekleri, 15–25°C arasında saklandığında veya taşındığında, 16 saate kadar olan geçici taşıma sürecinde 15–30°C arasında 7 gün boyunca stabildir. Plazmanın ayrılmasından sonra, aşağıdaki **Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi** bölümünde belirtilen şekilde saklayın.

Not: Roche cfDNA tüpünde toplanan kandan ayrılan plazmada hemoliz gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, $\leq 2,0$ g/L'deki hemoglobin konsantrasyonlarının, cobas EGFR Test'in performansını etkilemediği gösterilmiştir.

K2 EDTA Toplama Tüpü

K2 EDTA tüplerinde tam kandan toplanan plazma, cobas EGFR Test ile kullanım için doğrulanmıştır.

K2 EDTA tam kan, $\leq 30^\circ\text{C}$ 'de 8 saate kadar saklanabilir. Plazmanın ayrılmasından sonra, aşağıdaki **Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi** bölümünde belirtildiği gibi saklayın.

Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi

Plazma örneklerinin taşınması, etiyolojik ajanların taşınmasıyla ilgili ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.¹⁸

Plazma örnekleri, aşağıdakilerden birinde stabildir:

Plazma Örneği Saklama Sıcaklığı	≤ -70°C	-15°C ila -25°C	2°C ila 8°C	15°C ila 30°C
Roche cfDNA Plazma için Saklama Süresi	30 güne kadar	30 güne kadar	7 güne kadar	1 güne kadar
K2 EDTA Plazma için Saklama Süresi	12 aya kadar	12 aya kadar	3 güne kadar	1 güne kadar

İşlenmiş örneklerin saklanması ve stabilitesi

Roche cfDNA tüpünden veya K2 EDTA tüpünden elde edilmiş plazmadan işlenmiş örnek (ekstrakte edilen cfDNA), aşağıdakilerden birinde stabildir:

Ekstrakte Edilmiş cfDNA Saklama Sıcaklığı	-15°C ila -25°C	2°C ila 8°C	15°C ila 30°C
Saklama Süresi	60 gün boyunca 2 kez dondurma/çözmeye kadar	21 güne kadar	7 güne kadar

Ekstrakte edilmiş cfDNA, önerilen saklama dönemleri içinde ya da DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan cobas® cfDNA Sample Preparation Kit'in son kullanma tarihinden önce (hangisi ilk önce gelirse) kullanılmalıdır.

Ekstrakte edilen, saklanan DNA stoklarını kullanmadan önce, stoku içeren elüsyon tüpüne puls vorteks uygulayın ve santrifüjleyin.

Test prosedürü

Testin uygulanması

Şekil 6 cobas® cfDNA Sample Preparation Kit ile cobas EGFR Test iş akışı

1	Sistemi başlatın
2	Cihaz bakımını gerçekleştirin
3	Örnekleri ve reaktifleri depodan çıkarın
4	Sütuna bağlanma için örnekleri hazırlayın
5	DNA izolasyonunu gerçekleştirin
6	DNA'yı elüte edin
7	İş siparişi oluşturun ve plaka yerleşim planının çıktısını alın
8	Amplifikasyon reaktiflerini hazırlayın
9	AD plakasına amplifikasyon reaktiflerini yerleştirin
10	AD plakasına örneği yerleştirin
11	AD plakasını kapatın
12	AD plakasını cobas® z 480 analizöre yerleştirin
13	Çalışmayı başlatın
14	Sonuçları gözden geçirin
15	LIS ile: sonuçları LIS'e gönderin
16	Analizörü boşaltın

Kullanım talimatları

Not: Yalnızca Roche cfDNA tüpünde veya K2 EDTA tüpünde toplanan kandan ayrılan plazma, cobas EGFR Test ile kullanım için doğrulanmıştır.

Not: cobas® z 480 analizörünün ayrıntılı çalışma talimatları için cobas® z 480 analizörünün Cihaz Kılavuzuna bakın.

Çalışma hacmi

Tek bir çalışma döngüsü, 96 kuyucuklu AD plakası başına 1 ila 30 örnek (artı kontroller) içerebilir. 24'ten fazla örnekle çalışırken birden fazla cobas EGFR Test kiti gerekli olacaktır.

cobas EGFR Test kiti, kit başına maksimum 24 örnek için 3 örneğin (artı kontroller) 8 çalışması için yeterli reaktif içerir.

Tam işlem kontrolü

Bu test, tam işlemli bir negatif kontrolü gerektirir. Her çalışma için, DNA izolasyon prosedüründen başlayarak örnek(ler) ile eşzamanlı bir negatif kontrol işleyin.

DNA izolasyonu

DNA, cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) kullanılarak plazma örneklerinden izole edilir.

Amplifikasyon ve saptama

Not: Çalışma MMX'inin DNA örnekleriyle kontamine edilmesini önlemek için, amplifikasyon ve saptama işlemleri DNA izolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir. Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.

Cihaz düzeneği

cobas® z 480 düzeneğinin ayrıntılı talimatları için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Test siparişi düzeneği

EGFR iş akışı adımlarıyla ilgili ayrıntılı talimatlar için cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Çalışmadaki tüm örnek ve kontrollerin konumunu içeren bir plaka yerleşim haritası oluşturun. Yalnızca plazma örneklerini içeren bir çalışmada Mutant Kontrol, plaka üzerinde A01–A03 konumlarına yüklenir. Negatif Kontrol, plaka üzerinde B01–B03 konumlarına yüklenir. Örnekler daha sonra Şekil 7 içinde gösterildiği gibi C01–C03'ten başlayarak H10–H12'ye kadar 3 sütunluk setler halinde eklenir.

cobas EGFR Test, karışık test modunda çalıştırılabilir (ör., EGFR Tissue ile EGFR Plazma). Kontrol konumları, seçilen testlere ve örnek numaralarına göre farklılık gösterebilir. Karışık test çalışması düzeneği hakkında ayrıntılı bilgi için cobas® EGFR Mutation Test v2 için Yazılım Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Şekil 7 cobas EGFR Test için plaka yerleşim düzeni

Satır/Sütun	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

Burada: MC = Mutant Kontrol, NEG = Negatif Kontrol; S# = örnek kimliği ve MMX #, Master Mix Reagent 1, 2 veya 3 v2'yi belirtir.

Not: Yanıt oluşturmak için herhangi bir örnek, bir satırda art arda gelen üç sütuna yayılmalıdır.

Not: Çalışma Master Mix 1, plaka üzerinde 01, 04, 07 ve 10 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 2, plaka üzerinde 02, 05, 08 ve 11 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 3 v2, plaka üzerinde 03, 06, 09 ve 12 sütunlarına yüklenmelidir.

Not: Tek plakaya 30'a kadar örnek yüklenebilir. Plakadaki tüm örnekleri işlemek için birden fazla reaktif kiti gerekiyorsa, kitlerin tümü aynı lottan olmalıdır.

Reaksiyon düzeneği

Çalışma master mix'inin hazırlanması (MMX-1, MMX-2 ve MMX-3 v2)

Not: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ve çalışma MMX'i ışığa karşı duyarlıdır ve uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır.

Not: Çalışma MMX'i ve EGFR MMX reaktiflerinin viskozitesinden ötürü, tüm karışımın uçtan tamamen dağıtıldığından emin olmak için yavaşça pipetleyin.

Not: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 ve EGFR MMX-3 v2, açık mavi/morumsu renkte görülebilir. Bu durum reaktifin performansını etkilemez.

Not: Ayrı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinde biri EGFR MMX-1, biri EGFR MMX-2 ve diğeri EGFR MMX-3 v2 içeren üç bulk çalışma MMX'i hazırlayın.

- Aşağıdaki formülü kullanarak her çalışma MMX'i için gerekli olan EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2 hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli olan EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2 hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 20 \mu\text{L}$$

- Aşağıdaki formülü kullanarak her çalışma MMX'i için gerekli MGAC hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli MGAC hacmi} = (\text{Örnek Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 5 \mu\text{L}$$

Çalışmaya dahil edilen örnek sayısına bağlı olarak çalışma MMX'inin hazırlanması için gereken her reaktifin hacmini belirlemek için Tablo 22 kullanın.

Tablo 22 Çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için gerekli olan reaktiflerin hacimleri

		Örneklerin Sayısı*									
		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
Her Çalışma MMX'i için Toplam Hacim (µL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Örneklerin Sayısı için hacimler, Örneklerin Sayısı + 2 Kontrol + 1 toplamına dayanır

- Uygun sayıda EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ve MGAC flakonlarını 2°C ila 8°C sıcaklıktaki depodan çıkarın. Her reaktif 5 saniye vorteksleyin ve kullanmadan önce tüpün altındaki sıvıyı toplayın. Çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için steril bir mikrosantrifüj tüpünü etiketleyin.
- EGFR MMX-1 veya EGFR MMX-2 veya EGFR MMX-3 v2'nin hesaplanan hacmini ilgili çalışma MMX'i tüpüne ekleyin.
- MGAC'nin hesaplanan hacmini çalışma MMX'i tüplerine ekleyin.
- Yeterli karışımı sağlamak için tüpleri 3 ila 5 saniye vorteksleyin.

Not: Örnekler ve kontroller, çalışma MMX'leri hazırlandıktan sonra 1 saat içinde AD plakasına eklenmelidir.

Not: Sadece **cobas® 4800 Sistemi AD plakası ve Kapatıcı film kullanın.**

Plakanın hazırlanması

Not: DNA stokları saklanarak kullanılırsa **Örneklerin taşınması, saklanması ve stabilitesi** bölümündeki talimatları takip edin.

1. Çalışma için gerekli olan AD plakasının her reaksiyon kuyucuğuna 25 µL çalışma MMX'i pipetleyin. Pipet ucunun kuyucuğun dışındaki plakaya temas etmesine izin vermeyin.
 - 01, 04, 07 ve 10 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-1'i (EGFR MMX-1 içeren) ekleyin.
 - 02, 05, 08 ve 11 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-2'i (EGFR MMX-2 içeren) ekleyin.
 - 03, 06, 09 ve 12 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-3 v2'yi (EGFR MMX-3 v2 içeren) ekleyin.
2. 25 µL EGFR MC'yi AD plakasının A01, A02 ve A03 kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.
3. Yeni bir pipet ucu kullanarak, 25 µL NEG'i AD plakasının B01, B02 ve B03 kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.

Not: Her çalışma A01, A02 ve A03 kuyucuklarında EGFR MC ve B01, B02 ve B03 kuyucuklarında NEG içermelidir aksi halde çalışma **cobas® z 480 analizörü** tarafından geçersiz kılınacaktır.

Not: Örnekten örneğe geçebilecek kontaminasyona veya PCR reaksiyon tüpü kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için gerektiği biçimde eldivenlerinizi değiştirin.

4. Her örnek DNA'sı için yeni pipet uçları kullanarak, örnek DNA'sının her bir kuyucuğa eklenmesi için yeni bir uç kullanarak AD plakasının C01, C02 ve C03 kuyucuklarına ilk örnek DNA'sından 25 µL ekleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak her kuyucuğu iyice karıştırın. Bu prosedürü her örnekteki DNA için tekrarlayın ve tüm DNA örnekleri AD plakasına yüklenene kadar Şekil 7 içindeki şablonu takip edin. Tüm sıvının kuyucukların tabanında toplandığından emin olun.

Not: Saklanan DNA stoklarını kullanmadan önce, stoku içeren elüsyon tüpüne puls vorteks uygulayın ve santrifüjleyin.

5. AD plakasını kapatıcı film (plakalarla birlikte verilen) ile örtün. Filmi AD plakasına sağlam bir şekilde yapıştırmak için kapatıcı film aplikatörünü kullanın.
6. PCR'yi başlatmadan önce tüm sıvının her kuyucuğun tabanında toplandığını onaylayın.

Not: Amplifikasyon ve saptama, çalışma MMX'ine ilk örnek DNA dilüsyonunun eklenmesinden sonraki 1 saat içinde başlatılmalıdır.

PCR'nin başlatılması

EGFR iş akışı adımları hakkında ayrıntılı talimatlar için **cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna** veya **cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına** bakın. “Select test” açılır penceresi açıldığında, “EGFR Plazma P1” (EGFR Plazma P1) seçin ve “OK” (Tamam) düğmesine tıklayın.

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması

Not: Tüm çalışma ve örnek doğrulama işlemleri **cobas® 4800** yazılımıyla gerçekleştirilir.

Not: Geçerli bir test çalışması hem geçerli hem de geçersiz örnek sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, örnek sonuçları Tablo 23'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 23 cobas EGFR Test için sonuçların yorumlanması

Test sonucu	Mutasyon Sonucu	Yarı-Kantitatif İndeks (SQI) Sonucu	Yorum
Mutasyon Saptandı	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Birden fazla mutasyon mevcut olabilir)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (Birden fazla mutasyon mevcut olabilir)	Belirtilen hedeflenen EGFR bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptanmadı (NMD)*	Yok	Yok	Hedeflenen EGFR bölgelerinde mutasyon saptanmadı
Geçersiz	Yok	Yok	Örnek sonucu geçersizdir. Aşağıdaki Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi adlı bölümde yer alan yönergeleri izleyerek geçersiz sonuç içeren örnekleri yeniden test edin.
Başarısız	Yok	Yok	Donanım veya yazılım hatası nedeniyle çalışma başarısız oldu. Teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

* “Mutasyon Saptanmadı” sonucu, sonuçların mutant sekanslarının konsantrasyonuna, yeterli örnek bütünlüğüne, inhibitörlerin yokluğuna ve saptanacak yeterli DNA'ya bağlı olmasından ötürü hedeflenen EGFR bölgelerinde bir mutasyonun varlığını engellemez.

Sonuç işaretleri Results (Sonuçlar) sekmesinin (ekranda) veya Flags (İşaretler) sütununun (raporda) altında görülebilir. Daha ayrıntılı bilgi için **Sonuç işaretleri** bölümüne bakın.

Yarı-Kantitatif İndeks (SQI)

SQI, zaman içinde mutasyon yükündeki farklılıkları ölçmek için kullanılabilen bir örnekteki mutant cfDNA miktarının yarı kantitatif bir ölçüsüdür. SQI değerindeki artış, tek bir örnek kaynağı içinde karşılık gelen hedef mutasyon miktarında bir artışı belirtirken SQI değerindeki azalma, tek bir örnek kaynağı içinde karşılık gelen hedef mutasyonun toplam miktarındaki bir azalmayı gösterir. Test tarafından saptanan her EGFR mutasyon sınıfı için temsili SQI sonuçları, Şekil 8 – Şekil 14 içindeki doğrusalılık sonuçlarında gösterilir.

Sonuçları geçersiz örneklerin yeniden test edilmesi

1. Çalışma geçersizse, Amplifikasyon ve Saptamayı tekrarlamak üzere her örnek için yeterli miktarda ekstrakte edilmiş DNA bulunmayacaktır. DNA izolasyonundan başlayarak tüm örnekler için bütün test prosedürünü tekrarlayın.
2. Çalışma geçerli ancak örnek geçersizse, Amplifikasyon ve Saptamayı tekrarlamak üzere her örnek için yeterli miktarda ekstrakte edilmiş DNA bulunmayacaktır. DNA izolasyonundan başlayarak geçersiz örnek için bütün test prosedürünü tekrarlayın.

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği

30 örneğe kadar her bir çalışmaya, çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 v2 için bir set **cobas** EGFR Test Mutant Control (EGFR MC) (A01, A02 ve A03 kuyucukları) ve negatif kontrol (NEG) (B01, B02 ve B03 kuyucukları) dahil edilir. Hem EGFR MC hem de NEG geçerli ise çalışma geçerlidir. EGFR MC veya NEG geçersiz ise, tüm çalışma geçersizdir ve tekrar edilmelidir.

Mutant kontrolü

EGFR MC sonucu “Geçerli” olmalıdır. EGFR MC sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Negatif kontrol

NEG sonucu “Geçerli” olmalıdır. NEG sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Prosedür ile ilgili sınırlamalar

1. Yalnızca belirtilen örnek tiplerini test edin. **cobas** EGFR Test, Roche cfDNA tüpünde veya K2 EDTA tüpünde toplanan kandan ayrılan plazma ile kullanım için doğrulanmıştır.
2. **cobas** EGFR Test performansı, **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit kullanılarak doğrulanmıştır.
3. Bir mutasyonun saptanması örnekte mevcut olan kopya sayısına bağlıdır ve örneğin bütünlüğünden, izole edilen DNA konsantrasyonundan ve etkileşimde bulunan maddelerin varlığından etkilenebilir.
4. Alınan sonuçların güvenilir olması gerekli ve yeterli taşıma, depolama ve işleme alma koşullarına bağlıdır. Bu Kullanım Talimatlarında ve **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzunda veya **cobas**® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımında yer alan prosedürleri takip edin.
5. Elüsyon tüpünün altından pipetlemek peleti bozabilir ve test sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilir.
6. AmpErase enziminin **cobas** EGFR Test Master Mix'e eklenmesi, hedef DNA'nın selektif amplifikasyonunu sağlar; ancak iyi laboratuvar uygulamaları ve bu Kullanım Talimatlarında belirtilen prosedürlere tam uyum, reaktiflerde kontaminasyondan kaçınmak için gereklidir.
7. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas**® 4800 Sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanmalıdır.
8. Sadece **cobas**® z 480 analizörünün bu ürünle kullanılması onaylanmıştır. Başka gerçek zamanlı optik saptama sistemi olan hiçbir termal döngüleyici bu ürünle kullanılamaz.
9. Teknolojiler arasındaki içsel farklılıklardan ötürü, bir teknolojiye geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını değerlendirmek için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları önerilir.
10. PCR inhibitörlerinin varlığı sonuçların yanlış negatif veya geçersiz olmasına yol açabilir.

11. Nadir olmakla birlikte **cobas** EGFR Test'te kullanılan primerler veya proplar tarafından kapsanan EGFR geninin genomik DNA bölgelerindeki mutasyonlar, 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarında mutasyon varlığının saptanamamasına neden olabilir ("Mutasyon Saptanmadı" sonuçları).
12. **cobas** EGFR Test, TKI tedavisine direnç gösterebilen nadir bir edinilmiş mutasyon olan ekzon 19 L747S mutasyonuna çapraz reaktivite ("Mutasyon Saptandı" sonuçları) gösterir.¹⁹
13. Yüksek konsantrasyonlarda ($> 10^5$ kopya/mL) test edilen örnekler yanlış sonuçlar verebilir.
14. **cobas** EGFR Test, reaksiyon kuyucuğu başına 25 µL DNA stoku ile kullanım için doğrulanmıştır. Reaksiyon kuyucuğu başına 25 µL'den daha az DNA stoku girdi hacimleri önerilmez.
15. Tablo 3 içinde EGFR mutasyonları için Roche cfDNA tüpünde veya K2 EDTA tüpünde toplanan kandan ayrılan her mL plazma için ≥ 100 mutant DNA kopyası saptamak üzere yukarıda açıklanan prosedür takip edilmelidir.
16. "Mutasyon Saptanmadı" olarak raporlanan sonuçlara sahip örnekler, test tarafından saptanmayan EGFR mutasyonlarını içerebilir.
17. Plazmanın doku testine yönlendirilmesi veya doku testi ile doğrulanması için "Mutasyon Saptanmadı" sonucu dikkate alınmalıdır.
18. Roche cfDNA tüpünde toplanan tam kandan elde edilen plazma, yalnızca tek seferlik test için yeterlidir.
19. Aynı anda çekilmeyen hasta alımlarından toplanan plazmalar kombine edilmemelidir.
20. Roche cfDNA tüpü ile toplanan pıhtılaşmış örneklerle **cobas** EGFR Test performansı belirlenmemiştir. Pıhtılaşmış örnekler reddedilmeli ve hastadan yeni bir örnek alınmalıdır.
21. Roche cfDNA tüpünde toplanan kandan ayrılan plazmada hemoliz gözlemlenmiştir. $> 2,0$ g/L'deki hemoglobinin konsantrasyonları, **cobas** EGFR Test performansı ile etkileşimde bulunabilir.

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Analitik performans

Aşağıdaki veriler cobas EGFR Test'in analitik performansını göstermek için hazırlanmıştır.

Analitik hassasiyet – boş sınırı

Bir şablon olmadığında cobas EGFR Test'in performansını değerlendirmek ve bir boş örneğin düşük bir mutasyon konsantrasyonuna işaret edebilecek bir analitik sinyal oluşturmadığından emin olmak için sağlıklı donörün K2 EDTA plazma EGFR yabanıl tip örnekleri değerlendirilmiştir. CLSI EP17-A2 kılavuzunda açıklanan analiz kullanılarak²⁰ Boş Sınırı, tüm mutasyonlar için sıfır olarak saptanmıştır.

Hücre hattı DNA'sı kullanılarak saptama limiti

K2 EDTA plazma

Test tarafından saptanan yedi mutasyon sınıfının her birini içeren hücre hattı DNA'ları, EGFR için yabanıl tip olan sağlıklı donör K2 EDTA plazmasına ilave edilmiştir. Seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve her bir panel ögesinin 24 kopyası, üç cobas EGFR Test kit lotunun her biri kullanılarak test edilmiştir.

Saptama Limiti, hedeflenen mutasyon için en az %95'lik bir EGFR “Mutasyon Saptandı” oranı veren en düşük DNA konsantrasyonu olarak test tarafından saptanan yedi mutasyon sınıfının her biri için belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 24 içinde gösterilmiştir.

Tablo 24 K2 EDTA Plazma ile cobas EGFR Test'in Saptama Limiti

EGFR Ekzonu	EGFR Mutasyon Grubu	EGFR Nükleik Asit Sekansı	İntakt* DNA LoD (kopya/mL)	Kesilmiş** DNA LoD (kopya/mL)	COSMIC ID 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

Gözlemlenen LoD'deki farklılıklar, temel DNA'daki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

* İntakt hücre hattı DNA'sı, yaklaşık 10.000 kopya/mL'lik bir WT DNA temeline sahiptir.

** Mekanik olarak ortalama 220 bp boyutuna kesilmiş hücre hattı DNA'sı, yaklaşık 100.000 kopya/mL'lik bir WT DNA temeline sahiptir.

Roche cfDNA plazması

Roche cfDNA tüpünde toplanan kandan ayrılan plazma için, LoD değerleri, EGFR için yabanıl tip olan sağlıklı donörün Roche cfDNA plazmasının testi ile saptanan yedi mutasyon sınıfının her birini içeren kesilmiş hücre hattı DNA'ları eklenerek doğrulanmıştır. Dilüsyonlar, Tablo 24 içinde gösterilen LoD konsantrasyonlarını hedef alarak hazırlanmıştır ve bir cobas EGFR Test kit lotu kullanılarak her örnek için 20 kopya test edilmiştir. Her mutasyon için gözlemlenen isabet oranı %100'dür.

Özetle, cobas EGFR Test, K2 EDTA veya Roche cfDNA plazma ile reaksiyon kuyucuğu başına 25 µL DNA stokunun standart girdisini kullanarak EGFR ekzon 18, 19, 20 ve 21'deki mutasyonları, plazma mL'si başına ≤ 100 mutant DNA kopyası ile saptayabilir.

Diğer ekzon 18, 19, 20 ve 21 mutasyonları için çapraz reaktivite

AURA Uzatma çalışması ve AURA2 klinik araştırma örnekleri

cobas EGFR Test, AURA Uzatma çalışması ve AURA2 klinik araştırma örneklerinde gözlemlenen aşağıdaki EGFR mutasyonları için “Mutasyon Saptandı” sonucunu vermiştir (Tablo 25). AURA Uzatma çalışması, AURA2 kohortundaki örnekleri desteklemek ve plazmada nadir olan mutasyonları saptama olasılığını arttırmak için kullanılmıştır. **cobas** EGFR Test’in bu mutasyonları saptamasındaki analitik performansı değerlendirilmemiştir.

Tablo 25 cobas EGFR Test ile çapraz reaksiyonda olduğu saptanan AURA Uzatma Çalışması ve AURA2 Çalışmasında gözlemlenen mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Bulunamadı
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Bulunamadı
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Bulunamadı

Özgüllük – mikroorganizma

cobas EGFR Test’in özgüllüğü, yabancı tip ve mutant EGFR sekanslarını içeren sağlıklı donör K2 EDTA plazma örneklerine eklendiğinde **cobas** EGFR Test ile çapraz reaksiyona veya etkileşime girmediği belirlenen 1×10^6 koloni oluşturabilen birimlerde *Staphylococcus epidermidis* test edilerek değerlendirilmiştir.

İnterferans

K2 EDTA plazma

Trigliseritler (37 mM CLSI, önerilen yüksek konsantrasyon²¹), 0,2 g/L bilirubin (konjuge olmayan veya konjuge, CLSI önerilen yüksek konsantrasyon²¹) ve hemoglobinin (1,5 g/L), potansiyel olarak yabancı tip ve mutant EGFR sekanslarını içeren sağlıklı donör K2 EDTA plazma örneklerine etkileşimde bulunan bir madde eklendiğinde **cobas** EGFR Test ile etkileşimde bulunmadığı gösterilmiştir. Plazmada 2,0 g/L konsantrasyonda hemoglobinin **cobas** EGFR Test ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. ≥ 60 g/L (60 g/L konsantrasyonda albümin, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon²¹) **cobas** EGFR Test ile etkileşimde bulunabilir.

Çalışma sonuçları, EDTA, Neupogen ve TARCEVA*’nın, yabancı tip ve mutant EGFR sekansları içeren sağlıklı donör K2 EDTA plazma örneklerine potansiyel olarak etkileşimde bulunan maddeler eklendiğinde **cobas** EGFR Test’in performansı ile etkileşimde bulunmadığını göstermektedir.

Roche cfDNA plazması

Trigliseritler (37 mM, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon²¹), 0,2 g/L bilirubin (konjuge olmayan veya konjuge, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon²¹), hemoglobin (2,0 g/L) ve albuminin (60 g/L, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon²¹), yabancı tip ve mutant EGFR sekanslarını içeren sağlıklı donör Roche cfDNA plazma içeren örnekler potansiyel olarak etkileşimde bulunan bir madde eklendiğinde **cobas** EGFR Test ile etkileşimde bulunmadığı gösterilmiştir.

Doğrusallık

K2 EDTA plazma

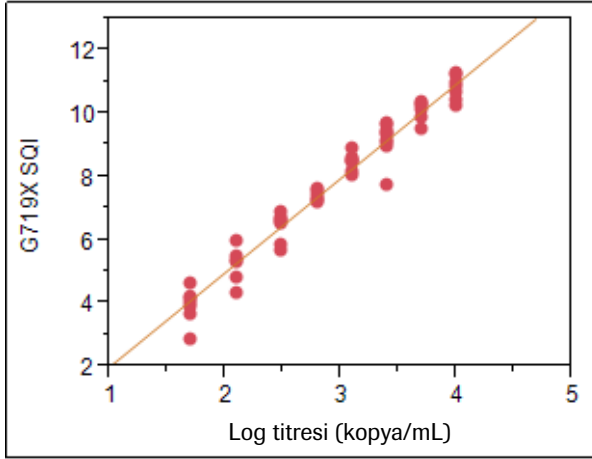
cobas EGFR Test'in doğrusallık çalışması, test tarafından raporlanan her EGFR mutasyon sınıfı için baskın mutasyonun doğrusal aralığını kapsayan en az 8 panel ögesinden oluşan dilüsyon serisiyle gerçekleştirilmiştir. Panel ögeleri, baskın mutasyonların her birini içeren hücre hattı DNA'larının, EGFR için yabancıl tip olan sağlıklı donör K2 EDTA plazmasına seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Değerlendirme, CLSI Kılavuzu EP-06A'ya göre gerçekleştirilmiştir.²⁴ 2 lotun her biri için panel ögesi başına on kopya, 1,0E+04 kopya/mL'ye kadar (seviye başına toplam 20 kopya) olan konsantrasyonlar için test edilmiştir. 1,0E+04 kopya/mL'nin üzerinde lot başına bir kopya test edilmiştir.

cobas EGFR Test'in her mutasyon sınıfı için doğrusal aralığı Tablo 26 içinde belirtilmiştir ve bir lot için ilgili grafikler Şekil 8 ila Şekil 14 içinde gösterilmiştir.

Tablo 26 K2 EDTA plazma ile cobas EGFR Test'in doğrusal aralığı

EGFR Ekzonu	EGFR Mutasyonu	Hedef Nükleik Asit Sekansı	Doğrusal Aralık (kopya/mL)
18	G719A	2156G>C	50–1E+04
19	Ekzon 19 Delesyon	2235_2249del15	10–1E+05
20	S768I	2303G>T	10–1E+05
20	T790M	2369C>T	50–1E+05
20	Ekzon 20 Ekleme	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10–1E+05
21	L858R	2573T>G	10–1E+05
21	L861Q	2582T>A	10–1E+05

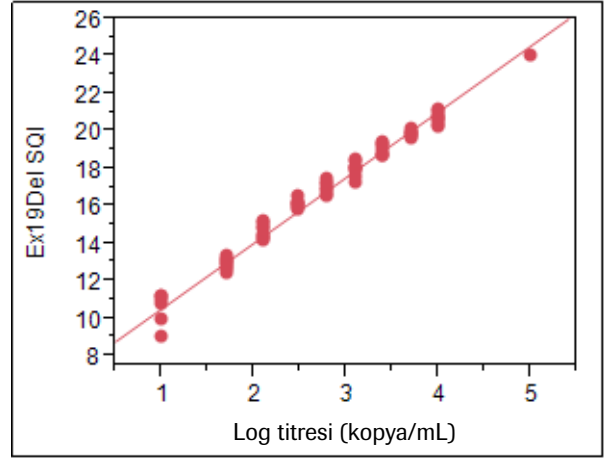
**Şekil 8 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
G719A hücre hattı DNA'sı**



$$\text{SQI} = -0,987 + 2,986 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,968$$

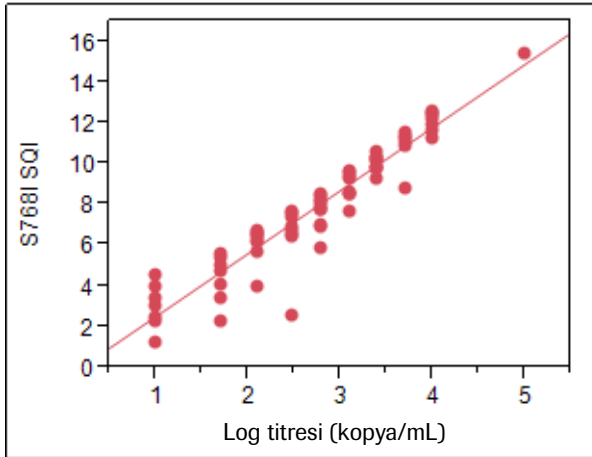
**Şekil 9 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
Ex19 Del hücre hattı DNA'sı**



$$\text{SQI} = 7,042 + 3,507 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,981$$

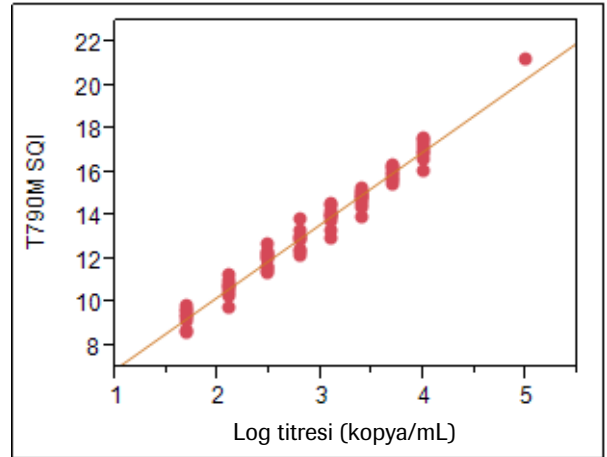
**Şekil 10 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
S768I hücre hattı DNA'sı**



$$\text{SQI} = -0,578 + 3,093 \times \log \text{ kopya/mL}$$

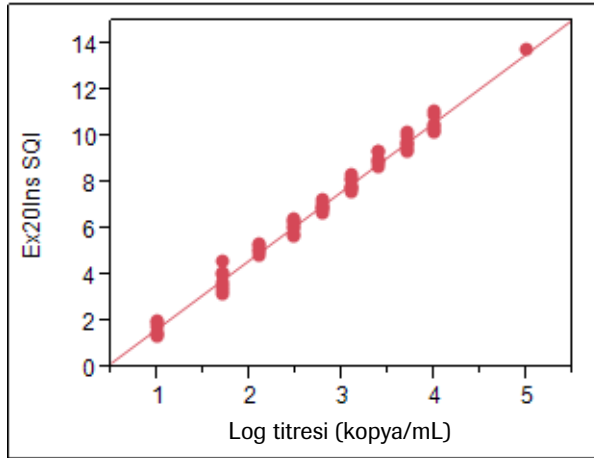
$$R^2 = 0,912$$

**Şekil 11 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
T790M hücre hattı DNA'sı**



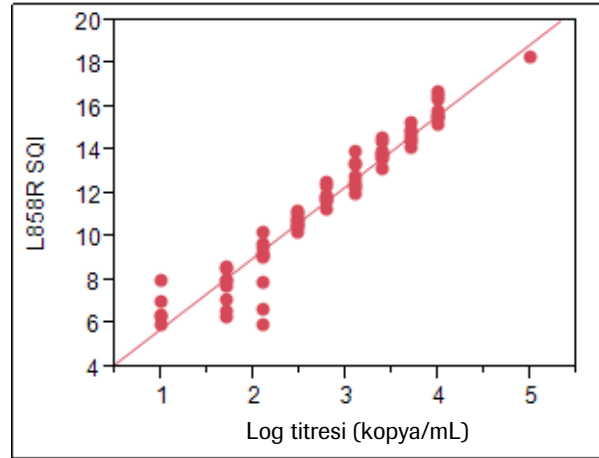
$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,973$$

Şekil 12 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
Ex20Ins hücre hattı DNA'sı

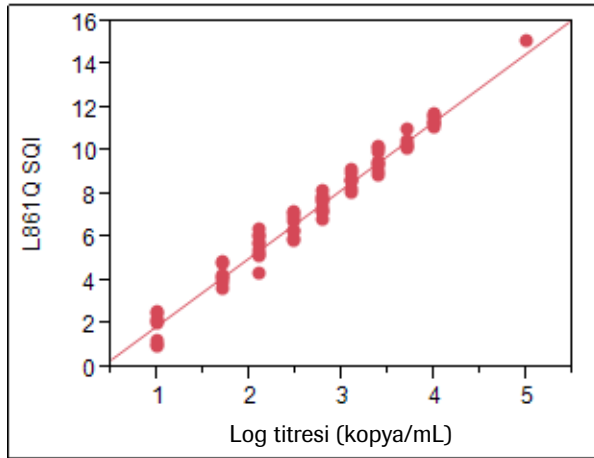
$$SQI = -1,268 + 2,973 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,990$$

Şekil 13 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
L858R hücre hattı DNA'sı

$$SQI = 2,543 + 3,283 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,933$$

Şekil 14 K2 EDTA Plazma'da mutant DNA'nın doğrusallığı
L861Q hücre hattı DNA'sı

$$SQI = -1,177 + 3,149 \times \log \text{ kopya/mL}$$

$$R^2 = 0,980$$

Roche cfDNA plazması

Roche cfDNA plazması ile doğrusal aralık, K2 EDTA plazma örnekleri ile oluşturulan doğrusal aralığı kapsayan en az 6 panel ögesinden oluşan bir dilüsyon serisi kullanılarak doğrulanmıştır (Tablo 26). Panel ögeleri, baskın mutasyonların her birini içeren kesilmiş hücre hattı DNA'sının EGFR yabanıl tip, sağlıklı donör Roche cfDNA plazmasına seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Değerlendirme, CLSI Kılavuzu EP06-A'ya göre gerçekleştirilmiştir.²⁴ 2 lotun her biri için panel ögesi başına dört kopya, 1,0E+04 kopya/mL'ye kadar (seviye başına toplam 8 kopya) olan konsantrasyonlarda test edilmiştir. 1,0E+04 kopya/mL'nin üzerinde, lot başına 2 kopya test edilmiştir (seviye başına toplam 4 kopya).

Tekrarlanabilirlik

cobas EGFR Test'in tekrarlanabilirliği, sağlıklı donör K2 EDTA plazma örneklerinde seyreltilmiş EGFR Mutant hücre hattı DNA'sının dilüsyonlarından oluşan on iki örnekle bir panel kullanılarak değerlendirilmiştir. Test tarafından raporlanan her sınıf için baskın mutasyon, on bir örnekte birlikte seyreltilmiştir ve $3 \times$ her mutasyonun ilgili LoD değerinde (kopya/mL olarak), $1,0E+03$ kopya/mL ve $5,0E+04$ kopya/mL'de değerlendirilmiştir. Ek olarak bir yabancı tip örnek test edilmiştir. On iki örneğin her biri iki operatör tarafından iki farklı reaktif lotu kullanılarak iki **cobas® z 480** analizöründe 4 gün boyunca (örnek başına $N = 32$) iki kez test edilmiştir. **cobas** EGFR Test, %99,2 (381/384) doğru karar oranına sahiptir.

Tablo 27 içinde tekrarlanabilirlik çalışmasından ortalama SQI ve SQI SD listelenmektedir. Yabancı tip örnek için 32 kopyanın tümü, beklenen "Mutasyon Saptanmadı" sonucunu vermiştir.

Tablo 27 Tekrarlanabilirlik çalışmasından ortalama SQI ve SQI SD

EGFR Ekzonu	EGFR Mutasyonu	Hedef Nükleik Asit Sekansı	Konsantrasyon (kopya/mL)	Ortalama SQI	SD 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 yabancı tip			0	NMD	NMD

"NMD" = Mutasyon Saptanmadı

Klinik performans değerlendirmesi

K2 EDTA plazma ile klinik tekrar üretilebilirlik

cobas EGFR Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 3 test merkezinde (2 harici ve 1 dahili, merkez başına 2 operatör), 3 reaktif lotu ve 3 ardışık olmayan test gününde KHD AK plazmada seyreltilmiş hücre hattı DNA'sını içeren yapay örneklerden oluşan dokuz ögeli bir panel ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bir ekzon 18 G719X mutasyonu, bir ekzon 19 delesyon mutasyonu, iki ekzon 20 T790M mutasyonu, bir ekzon 20 ekleme mutasyonu, bir ekzon 21 L858R mutasyonu ve bir ekzon 21 L861Q mutasyonunu içeren mutasyonlar, Tablo 28 içinde özetlenen şekilde dört yapay örnekte temsil edilmiştir. Her bir yapay örnek iki seviyede hazırlanmıştır: yaklaşık 100 kopya/mL ve 300 kopya/mL. Bu yapay örnekler, dokuz ögeli bir panel oluşturmak için yabancı tipte bir kontrolle birlikte sekiz ayrı panel ögesine yerleştirilmiştir.

Tablo 28 Yapay örnek mutasyon kombinasyonları

Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 1	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 2	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 3	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 4
Ekzon 19 Del	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Ekzon 20 Ins

36 geçerli çalışma ve bir geçersiz çalışma ile toplam 37 çalışma gerçekleştirilmiştir. Toplam 648 panel (veya 1224 mutasyon) test edilmiştir ve 646 panel (veya 1220 mutasyon) geçerli sonuçlara sahiptir. Yabancı tip panel ögesinin geçerli olan 72 testinde “Mutasyon Saptandı” sonucu bulunmamıştır ve %100 uyum sağlanmıştır. Mutasyon ögeleri için uyumlar değişiklik göstermektedir: sekizinde %100, beşinde > %97 uyum elde edilmiştir ve bir mutasyon ise (G719X) yaklaşık %90 olarak daha düşük uyum göstermiştir. Mutasyonlarla genel uyum için sonuçlar, Tablo 29 içinde gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı (CV), tüm mutant panel ögelerinde ≤ %12,8'dir. Dahili ve Mutant kontroller için genel CV ≤ %1,5'tir. CV, lotlar arası ≤ %0,89 ve lot içi ≤ %1,47'dir.

Tablo 29 Tekrar üretilebilirlik çalışmasında mutasyon ögesi tarafından genel uyum tahminleri

Mutasyon Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum N	Uyum % (%95 GA) ^a
Yabanıl tip – uygulanmaz	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 18 G719A – 100 kopya/mL	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
Ekzon 19 Delesyon (2235_2249del15) – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme (2307_2308ins9) – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 S768I – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 100 kopya/mL	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
Ekzon 21 L858R – 100 kopya/mL	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Ekzon 21 L861Q – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 18 G719A – 300 kopya/mL	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon (2235_2249del15) – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme (2307_2308ins9) – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 S768I – 300 kopya/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 300 kopya/mL	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
Ekzon 21 L858R – 300 kopya/mL	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekzon 21 L861Q – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)

^a %95 GA = %95 kesin binom güven aralığı.

^b Bu örnek için daha düşük uyum, birincil olarak üç merkezden birinden meydana gelen birden fazla yanıtsız karardan (n = 6/24 toplam kopya) kaynaklanmaktadır.

Not: Sonuçlar, bir Mutant Tipi panel ögesi geçerli bir “Mutasyon Saptandı” sonucuna sahip olduğunda veya yabanıl tip panel ögesi geçerli bir “Mutasyon Saptanmadı” sonucuna sahip olduğunda uyumludur.

Not: Bu çalışmada kullanılan örnekler, mekanik olarak ortalama 220 bp boyutunda kesilmiştir ve yaklaşık 12.000 kopya/mL'lik bir WT DNA temeline sahip hücre hattı DNA'sından oluşmaktadır.

Roche cfDNA plazması ile klinik tekrar üretilebilirlik

cobas EGFR Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 3 test merkezinde (2 harici ve 1 dahili, merkez başına 2 operatör), bir reaktif lotu ve 3 ardışık olmayan test gününde sağlıklı donör plazmasının üç benzersiz havuzunda seyreltilmiş hücre hattı DNA'sını içeren yapay örneklerden oluşan üç adet dokuz ögeli panel ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Her havuzdaki örnekler, Roche cfDNA tüplerinin benzersiz bir lotu ile toplanmıştır. Plazma panellerinden ikisi, her merkezde test edilmiştir. Bir ekzon 18 G719X mutasyonu, bir ekzon 19 delesyon mutasyonu, bir ekzon 20 T790M mutasyonu, bir ekzon 20 ekleme mutasyonu, bir ekzon 21 L858R mutasyonu ve bir ekzon 21 L861Q mutasyonunu içeren mutasyonlar, Tablo 30 içinde özetlenen şekilde dört yapay örnekte temsil edilmiştir. Her bir yapay örnek iki seviyede hazırlanmıştır: yaklaşık 100 kopya/mL ve 300 kopya/mL. Bu yapay örnekler, dokuz ögeli bir panel oluşturmak için yabanıl tipte bir kontrolle birlikte sekiz ayrı panel ögesine yerleştirilmiştir.

Tablo 30 Yapay örnek mutasyon kombinasyonları

Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 1	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 2	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 3	Hücre Hattı DNA'sı Kombinasyonu 4
Ekzon 19 Del	S768I	T790M	L858R
Ekzon 20 Ins	G719A	L861Q	Yok

Toplam 36 çalışma gerçekleştirilmiştir ve tümü geçerlidir. Toplam 648 panel test edilmiştir ve 646 panel (veya 1220 mutasyon) geçerli sonuçlara sahiptir. Yabanıl tip panel ögesinin geçerli olan 72 testinde bir “Mutasyon Saptandı” sonucu bulunmuştur ve %98,6 uyum sağlanmıştır. Mutasyon ögeleri için uyumlar farklılık göstermiştir: on üçünde %100, birinde > %98 uyum elde edilmiştir. Mutasyonlarla genel uyum için sonuçlar, Tablo 31 içinde gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı (CV), tüm mutant panel ögelerinde $\leq$ %13,7'dir. Dahili ve Mutant kontroller için genel CV $\leq$ %1,3'tür.

Tablo 31 Tekrar üretilebilirlik çalışmasında mutasyon ögesi tarafından genel uyum tahminleri

Mutasyon Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum N	Uyum % (%95 GA) ^a
Yabanıl tip – uygulanmaz	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekzon 18 G719A – 100 kopya/mL	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon (2235_2249del15) – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme (2307_2308ins9) – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 S768I – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 21 L858R – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 21 L861Q – 100 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 18 G719A – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon (2235_2249del15) – 300 kopya/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekzon 20 Ekleme (2307_2308ins9) – 300 kopya/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekzon 20 S768I – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 300 kopya/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekzon 21 L858R – 300 kopya/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekzon 21 L861Q – 300 kopya/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a %95 GA = %95 kesin binom güven aralığı.

Not: Sonuçlar, bir Mutant Tipi panel ögesi geçerli bir “Mutasyon Saptandı” sonucuna sahip olduğunda veya yabanıl tip panel ögesi geçerli bir “Mutasyon Saptanmadı” sonucuna sahip olduğunda uyumludur.

KHDAK plazma örneklerini kullanarak Saptama Limiti (LoD)

Üç ekzon 19 delesyonu, bir L858R mutasyonu ve bir T790M mutasyonu için üç test merkezinde (iki harici ve bir dahili, merkez başına iki operatör), üç reaktif lotu ve iki ardışık olmayan test gününde KHDAK plazma örneklerinin 11 ögeli bir paneli ile **cobas** EGFR Test kullanılarak K2 EDTA KHDAK plazma örnekleri ile LoD'u doğrulamak için bir çalışma gerçekleştirilmiştir (her biri iki seviyeli beş mutasyon: $1 \times$ LoD ve $2 \times$ LoD; artı WT). Genel olarak 12 çalışma yapılmıştır (çalışma başına iki kopya) ve tüm çalışmalar geçerlidir. 11 panel ögesi ile 262'si (%99,2) geçerli olmak üzere toplam 264 test gerçekleştirilmiştir. Yabanıl tip panel ögesinin 23 geçerli testinde “Mutasyon Saptandı” sonuçları gözlemlenmemiştir ve %100 uyum sağlanmıştır. Ekzon 20 T790M – $1 \times$ LoD için uyum yüzdesi %95,8'dir ve diğer tüm mutant panel ögeleri için %100'dür. Panel ögesine göre uyum tahminleri Tablo 32 içinde özetlenmiştir. Varyasyon katsayısı (CV), tüm mutant panel ögelerinde $<$ %7,0'dır.

Tablo 32 Panel ögesine göre uyum tahminleri

Panel Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum N	Uyum % (%95 GA) ^a
Yabanıl tip – uygulanmaz	23	23	100 (85,2, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 1 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 1 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 2 – 1 × LoD	23	23	100 (85,2, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 2 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 3 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 19 Delesyon 3 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 20 T790M – 1 × LoD	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
Ekzon 20 T790M – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 21 L858R – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekzon 21 L858R – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a %95 GA = %95 kesin binom güven aralığı.

Not: Geçerli bir Mutant Tipi panel ögesi testinin sonucu Mutasyon Saptandı şeklindeyse veya geçerli bir yabanıl tip panel ögesi testinin sonucu “Mutasyon Saptanmadı” ise sonuçlar uyumlu olarak dahil edilir.

Not: Bu çalışmada kullanılan klinik örnekler, yaklaşık 24.000 kopya/mL'lik WT DNA temeline sahiptir.

Roche cfDNA plazmasının K2 EDTA plazmasına korelasyonu

cobas EGFR Test'in, K2 EDTA plazması ve Roche cfDNA plazması ile performansı 34 EGFR yabanıl tip KHDAK hastası, 17 EGFR mutasyonu pozitif KHDAK hastası ve 20 sağlıklı donörden alınan eşleştirilmiş çekimleri içeren bir örnek paneli test edilerek karşılaştırılmıştır. Sağlıklı donörlerden yapılan alımlar, K2 EDTA ve Roche cfDNA tüplerine aktararak tam kana eklenen **cobas** EGFR Test tarafından raporlanan baskın mutasyonları içeren kesilmiş hücre hattı DNA'sından oluşan vekil örnekler oluşturmak için kullanılmıştır. Vekil örneklerdeki kesilmiş hücre hattı DNA'sı için spike seviyesi, K2 EDTA plazma ile belirlendiği üzere her mutasyon için yaklaşık $1,5 \times \text{LoD}$ 'dur (Tablo 24). Mutasyon durumu, bir NGS yöntemi kullanılarak her KHDAK hastası için doğrulanmıştır. Her örnek, bir lot **cobas** EGFR Test reaktifi ile test edilmiştir. Tüm örnekler geçerli sonuçlar vermiştir ve karşılaştırma sonuçları Tablo 33 içinde gösterilmiştir.

Tablo 33 K2 EDTA plazması ile Roche cfDNA tüpünden toplanan plazma arasındaki uyum analizi

		K2 EDTA Tüpü		Toplam
		MD	NMD	
Roche Hüresiz DNA Tüpü	MD	37	0	37
	NMD	0	34	34
	Toplam	37	34	71

Pozitif Uyum (%): %95 GA	%100 %90,5–100
Negatif Uyum (%): %95 GA	%100 %89,7–100
Genel Uyum (%): %95 GA	%100 %94,5–100

Burada: MD = Mutasyon Saptandı ve NMD = Mutasyon Saptanmadı.

K2 EDTA plazma için eşleştirilmiş örnekler ile Roche Hüresiz DNA Toplama Tüplerinden elde edilen plazma arasındaki uyum %100'dür. Uyumsuz sonuç gözlemlenmemiştir.

Çalışmadan alınan plazma örneklerinde, **cobas** EGFR Test, Tablo 34 içinde listelenen EGFR geninin 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarında saptanmıştır. Aksi belirtilmedikçe, KHDAK örneklerinde mutasyonlar gözlemlenmiştir.

Tablo 34 Roche cfDNA plazmasının K2 EDTA plazmasına korelasyonunda gözlemlenen mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID 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	Bulunamadı
	2237_2251del15 [§]	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC [§]	L747P	24267
	2251A>C [§]	T751P	Bulunamadı
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Yalnızca vekil örnekte gözlemlenmiştir

⁺ Vekil örnekte ve KHDAK örnekte gözlemlenmiştir

[§] Yalnızca KHDAK örnekte gözlemlenmiştir

ASPIRATION kohortundan Faz III plazma örneklerini kullanarak referans yöntemle korelasyon

cobas EGFR Test'in ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonlarının saptanmasındaki analitik doğruluğu, aşağıdaki çalışmaların bir veya daha fazlasından (ASPIRATION) ileri evre KHDAK hastalarından alınan K2 EDTA plazma örnekleri kullanılarak doğrulanmış bir yeni nesil sekanslama (NGS) platformuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (ASPIRATION Kohortu): Genentech klinik araştırmaları G027821 (MetMab) ve G027761 (MetLung) ile birlikte Roche klinik araştırması ML25637 (ASPIRATION).

2 mL hacimli ve hem plazmadaki **cobas** EGFR Test'ten hem de plazma örneklerini kullanan bir NGS yönteminden alınan geçerli eşleştirilmiş sonuçlara sahip yüz yirmi sekiz plazma örneği, EGFR ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonları için uyum analizine dahil edilmiştir. NGS yöntemine göre toplam 32 örnekte MD ve 95 örnekte NMD sonuçları elde edilmiştir. Plazmada **cobas** EGFR Test ile plazmada NGS arasındaki PPA %87,5 (%95 GA: %71,9, %95,0) olup Tablo 35 içinde gösterildiği şekilde **cobas** EGFR Test ile NGS arasındaki NPA %96,8'dir (%95 GA: %91,1, %98,9).

Tablo 35 EGFR ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonlarının saptanması için plazmada cobas EGFR Test'in NGS ile karşılaştırılması

Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%87,5 (28/32)	%71,9, %95,0
Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%96,8 (92/95)	%91,1, %98,9

ENSURE çalışmasından Faz III örnekleri kullanılarak ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonlarının saptanması için cobas EGFR Test ile plazma ve doku örnekleri arasındaki korelasyon

ENSURE çalışması (YO25121), tümörlerinde epidermal büyüme reseptörünün (EGFR) tirozin kinaz alanında ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonları olan evre IIIB/IV Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarında birinci basamak tedavi olarak TARCEVA®'nın (erlotinib) gemsitabin/sisplatine karşı etkililiğini ve güvenliğini değerlendirme amaçlı çok merkezli, açık etiketli, randomize bir Faz III çalışmasıdır. Toplam 647 hasta taranmıştır, 601 hasta cobas EGFR Test'ten ekzon 19 delesyonu ve L858R Mutasyonu için geçerli doku EGFR sonuçlarına sahiptir ve çalışmaya 217 hasta randomize edilmiştir.

Beş yüz on yedi hasta (%86,0, 517/601) K2 EDTA plazma ve doku örnekleriyle eşleşmiştir ve 441 hastada plazma örnek hacmi, yani plazmada cobas EGFR Test'in doğrulandığı örnek hacmi, $\geq 2,0$ mL'dir.

Ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonunun saptanması için cobas EGFR Test ile plazma ve doku örneklerinin korelasyonu hem ayrı ayrı hem de birlikte değerlendirilmiştir. cobas EGFR Test ile hem doku hem de plazma örneklerinden eşleştirilmiş geçerli sonuçları olan toplam 431 örnek, uyum analizine dahil edilmiştir. Plazma ve doku örneği arasındaki pozitif uyum yüzdesi (PPA) %76,7'dir (%95 GA: %70,5–81,9), negatif uyum yüzdesi (NPA) ise Tablo 36 içinde gösterilen şekilde toplu halde ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonunun saptanması için %98,2'dir (%95 GA: %95,4–99,3). Ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonunun saptanması için PPA, NPA ve OPA da ayrı ayrı Tablo 36 içinde gösterilmiştir.

Tablo 36 Ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonunun saptanmasında cobas EGFR Test ile plazma örnekleri ve doku örnekleri arasında uyum

Mutasyon	Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Toplu halde	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%76,7 (161/210)	%70,5, %81,9
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%98,2 (217/221)	%95,4, %99,3
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%87,7 (378/431)	%84,2, %90,5
Ekzon 19 Delesyon	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%80,8 (97/120)	%72,9, %86,9
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%98,7 (307/311)	%96,7, %99,5
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%93,7 (404/431)	%91,0, %95,7
L858R	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%67,8 (61/90)	%57,6, %76,5
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%99,1 (338/341)	%97,4, %99,7
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%92,6 (399/431)	%89,7, %94,7

Not: Referans olarak doku kullanılarak hesaplanan PPA ve NPA.

Ekzon 19 delesyonu ve L858R mutasyonlarının toplu olarak saptanması için pozitif tahmin değeri (PPV) ve negatif tahmin değeri (NPV), farklı popülasyon doku prevalansına dayalı önyüklemeye yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 37). Beklendiği şekilde EGFR mutasyon prevalansı arttıkça PPV artar ve NPV azalır. %10–15 doku EGFR mutasyon prevalansı olduğunu varsayan bir beyaz hasta popülasyonu için PPV %82,8–88,6 arasında değişirken NPV %96,0–97,4 arasında değişir. %30–50 doku EGFR mutasyon prevalansı olduğu varsayıldığında ise bir Asya popülasyonundaki prevalansa dayanması durumunda PPV %94,8–97,8 arasında değişirken NPV %80,8–90,9 arasında değişir.

Tablo 37 Farklılık gösteren doku EGFR mutasyon prevalansına dayanarak dokuda cobas EGFR Test ve plazmada cobas EGFR Test (plazma örneği hacimleri $\geq 2,0$ mL olan hastalar) için tahmini değerler

Doku Örneklerine Dayanan Varsayılan EGFR Prevalansı	Pozitif Tahmin Değeri (PPV)	Negatif Tahmin Değeri (NPV)
%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)

Not: %95 GA'lar, önyükleme yönteminden hesaplanmıştır.

Not: Hacmi < 2,0 mL olan 79 örneğin sonucu bu analizde geçersiz olarak değerlendirilmiştir.

Not: Referans olarak plazma kullanılarak hesaplanan PPV ve NPV.

AURA2 çalışmasından Faz II örneklerini kullanarak referans yöntemle korelasyon

cobas EGFR Test'in klinik performansı, TAGRISSO® ile Faz II AURA2 çalışmasında taranan ileri evre KHDAK hastalarından K2 EDTA plazma örnekleri kullanılarak doğrulanmış bir yeni nesil sekanslama (NGS) platformuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.²³

383 uygun hastadan 344'ünde plazma örneği mevcuttur ve 342 geçerli ve iki geçersiz sonuçla birlikte **cobas** EGFR Test ile test edilmiştir. **cobas** EGFR Test ile test edilen toplam 344 plazma örneğinden 322'si (%93,6) NGS yöntemiyle de test edilmiştir ve 22'sinde NGS tarafından test edilecek yeterli plazma hacmi kalmamıştır.

Plazma örneklerinde T790M mutasyonunun saptanması için referans yöntem olan NGS ile karşılaştırmalı **cobas** EGFR Test'in analitik doğruluğu değerlendirilmiştir. Hem **cobas** EGFR Test'ten hem de NGS sonuçlarından geçerli eşleştirilmiş sonuçlara sahip toplam 320 örnek, uyum analizine dahil edilmiştir. **cobas** EGFR Test ve NGS arasındaki pozitif uyum yüzdesi (PPA) %91,5'dir (%95 GA: %85,7–95,1), negatif uyum yüzdesi (NPA) ise Tablo 38 içinde gösterilen şekilde T790M mutasyonunun saptanması için %91,1'dir (%95 GA: %86,0–94,4).

Tablo 38 EGFR T790M mutasyonunun saptanması için plazmada NGS ile cobas EGFR Test'in karşılaştırılması

Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%91,5 (129/141)	%85,7, %95,1
Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%91,1 (163/179)	%86,0, %94,4

AURA2 çalışmasından K2 EDTA plazma örneklerinde, cobas EGFR Test, Tablo 39 içinde listelenen EGFR geninin 18, 19, 20 ve 21 ekzonlarında saptanmıştır.

Tablo 39 AURA2 kohortunda cobas EGFR Test ile saptanan mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon sekansı	AA değişikliği	COSMIC ID 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	Bulunamadı
	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	Bulunamadı
	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	Bulunamadı
	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

AURA2'den Faz II örnekleri kullanılarak T790M'nin saptanması için plazma ve doku örnekleri arasındaki korelasyon

AURA2 klinik araştırması²³ TAGRISSO®'nun (osimertinib) güvenliğini ve etkililiğini, onaylı EGFR TKI ajanı ile daha önce tedavi almasının ardından hastalığı ilerlemiş olan ileri evre KHDAK hastalarında ikinci veya ≥ üçüncü basamak tedavi olarak değerlendiren, çok merkezli, açık etiketli, tek kollu bir Faz II çalışmasıdır ve T790M, cobas EGFR Test tarafından saptanan şekilde pozitifdir. Toplam 472 hasta taranmıştır, 383 hastada doku örneği test edilmiştir ve 371 hastada cobas EGFR Test'ten T790M mutasyonu için geçerli bir doku EGFR sonucu elde edilmiştir; bunların 233'ü T790M pozitifdir ve 210 hasta çalışmaya randomize edilmiştir.

383 uygun hastadan 344'ünde K2 EDTA plazma örneği vardır. **cobas** EGFR Test ile hem doku hem de plazma örneklerinden eşleştirilmiş geçerli sonuçları olan toplam 334 örnek, analize dahil edilmiştir. Plazma ve doku örneği arasındaki pozitif uyum yüzdesi (PPA) %58,7'dir (%95 GA: %52,2, %65,0) ve negatif uyum yüzdesi (NPA) ise T790M mutasyonunun saptanması için %80,2'dir (%95 GA: %71,8, %86,5). Tablo 40 içinde gösterilen şekilde T790M mutasyonunun saptanması için pozitif tahmin değeri (PPV) %85,6 (%95 GA: %79,2, %90,3) ve negatif tahmin değeri (NPV) %49,2'dir (%95 GA: %42,0, %56,4).

Tablo 40 içinde gösterilen PPV, dokuda **cobas** EGFR Test ile T790M negatif ve plazmada **cobas** EGFR Test ile T790M pozitif olan 22 örnekten etkilenmiştir. On sekiz örneğin plazmada NGS tarafından T790M pozitif olduğu doğrulanmıştır ve bir örnek ise NGS testi için yeterli hacme sahip değildir. NGS tarafından yalnızca üçünün T790M negatif olduğu saptanmıştır.

Tablo 40 T790M mutasyonunun saptanmasında cobas EGFR Test ile plazma örnekleri ve doku örnekleri arasında uyum

Mutasyon	Uyum ölçütü	Uyum yüzdesi (N)	%95 GA
T790M	Pozitif Uyum Yüzdesi (PPA)	%58,7 (131/223)	%52,2, %65,0
	Negatif Uyum Yüzdesi (NPA)	%80,2 (89/111)	%71,8, %86,5
	Genel Uyum Yüzdesi (OPA)	%65,9 (220/334)	%60,6, %70,8
	Pozitif Tahmin Değeri (PPV)	%85,6 (131/153)	%79,2, %90,3
	Negatif Tahmin Değeri (NPV)	%49,2 (89/181)	%42,0, %56,4

Not: Referans olarak doku kullanılarak hesaplanan PPA ve NPA.

Not: Referans olarak plazma kullanılarak hesaplanan PPV ve NPV.

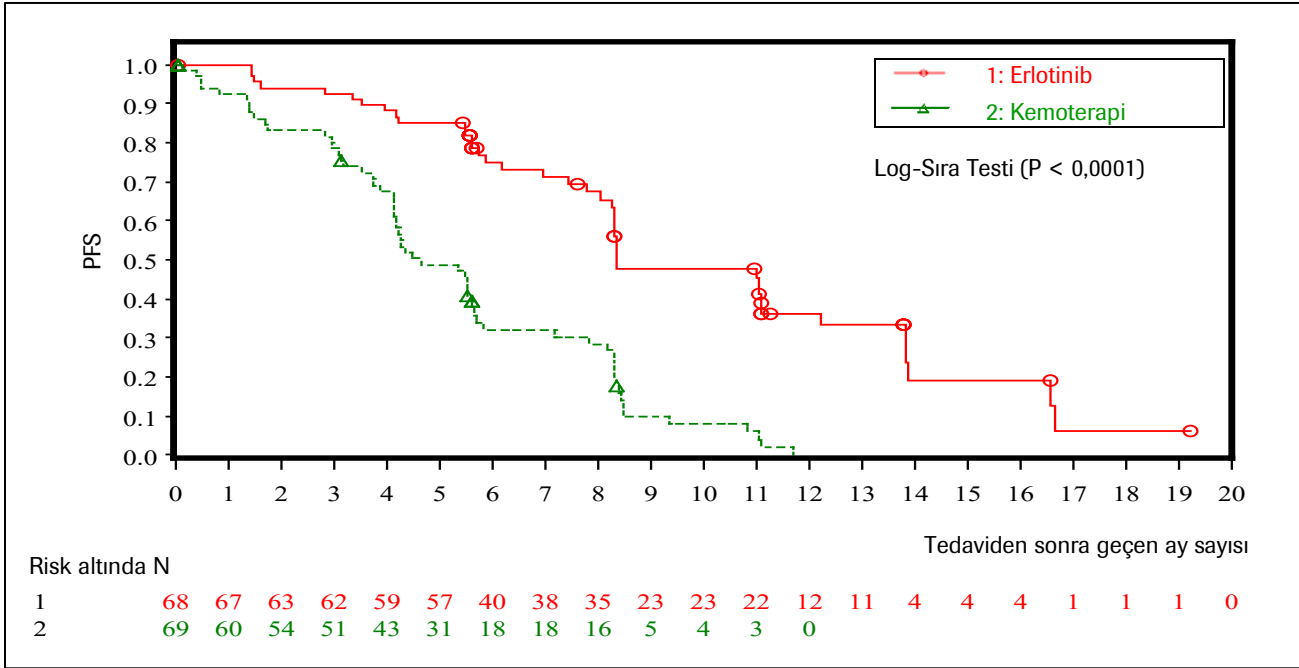
T790M dirençli mutasyonunun saptanmasında plazma ve doku örnekleri arasındaki uyum, aktive edici mutasyonlara göre daha düşüktür. PPA, dokunun heterojenliğinden etkilenebilir: aktive edici mutasyonlar L858R ve ekzon 19 delesyonlarının aksine, T790M, genellikle edinilmiş bir mutasyon olduğu için tümör hücrelerinin küçük bir yüzdesinde mevcut olabilir; bu nedenle, T790M cfDNA, plazmada yalnızca çok düşük konsantrasyonda ve saptama limitinin altında mevcut olabilir. NPA, tümörün heterojenliğinden de etkilenebilir: T790M mutasyonu tüm tümör hücrelerinde bulunmayabileceğinden, diğer tümör bölgeleri T790M pozitif olabilirken T790M mutasyonunun bulunmadığı bir tümörden doku biyopsisi alınabilir.⁷

Klinik sonuç verileri

ENSURE

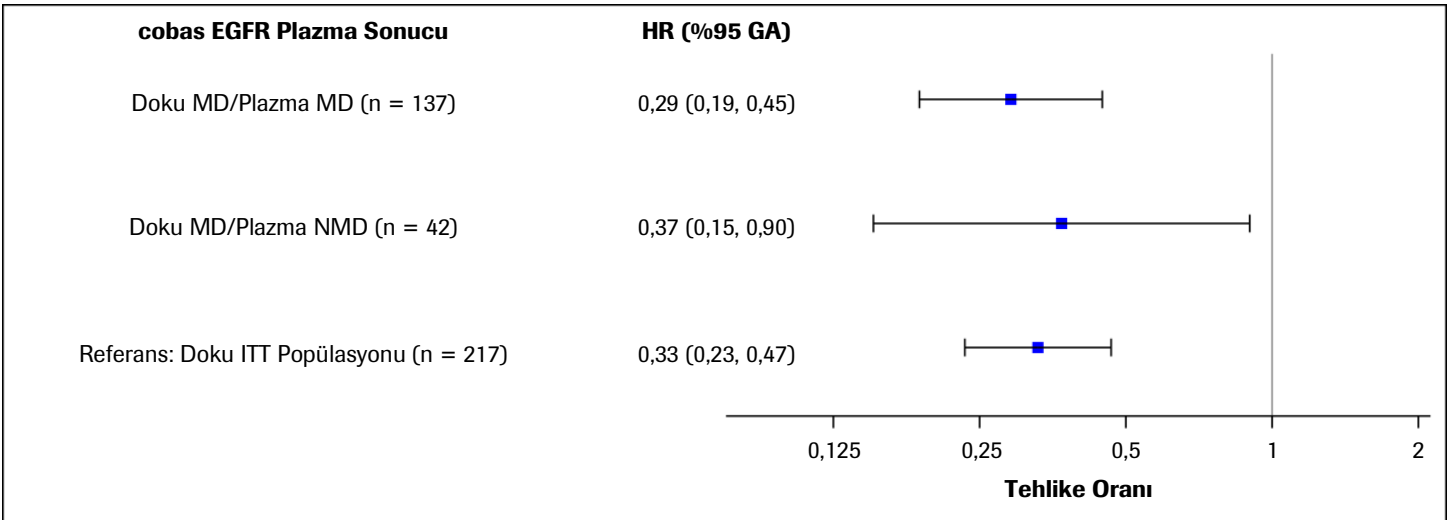
ENSURE çalışmasında, kayıtlı 217 hastanın (**cobas** EGFR Test v1 ile bir doku örneğinde saptanan bir ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonu olanlar), 214'ünde (%98,6) bir K2 EDTA plazma örneği mevcuttur ve 180 hasta da 2,0 mL'lik bir plazma örneği hacmine sahiptir. **cobas** EGFR Test ile test edilen 2 mL hacimli 180 plazma örneğinden 137'sinde ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonu için "Mutasyon Saptandı" sonucu vardır (erlotinib kolunda 68 hasta, kemoterapi kolunda 69 hasta), 42'sinde "Mutasyon Saptanmadı" sonucu vardır (TARCEVA® kolunda 22 hasta, kemoterapi kolunda 20 hasta) ve bir örnek de geçersiz sonuç üretmiştir. Araştırmacı tarafından değerlendirilen PFS için Kaplan-Meier eğrileri, bir plazma örneğinde ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonu olan hastalar için Şekil 15 içinde gösterilmiştir. TARCEVA® kolundaki hastalar, kemoterapi kolundaki hastalara kıyasla daha uzun PFS'ye sahiptir ve iki eğri, plazmada saptanabilir bir EGFR aktive edici mutasyonu olan hastalarda TARCEVA® ile tedaviye önemli fayda göstererek gözlem süresi boyunca iyi ayrılmıştır (p değeri < 0,001).

Şekil 15 Hem plazma hem de dokuda cobas EGFR Test ile mutasyon saptanan hastalar için tedaviye göre Kaplan-Meier PFS Grafiği (araştırmacı değerlendirmesi) (2 mL plazma örneği ile)



Plazma mutasyonu pozitif veya negatif olsun, doku EGFR mutasyonu pozitif olan ve plazma örnek hacimleri 2,0 mL olan tüm hastalarda tutarlı bir PFS faydası gözlemlenmiştir ve bu fayda, Şekil 16 içinde gösterilen şekilde genel ENSURE ITT popülasyonunda gözlemlenen PFS faydasına benzerdir (HR = 0,33; %95 GA: 0,23, 0,47).

Şekil 16 Araştırmacı değerlendirmesi tarafından PFS için HR'lerin Forest grafiği (2 mL plazma örnekleri ile)



Not: MD = Mutasyon Saptandı (ekzon 19 delesyonu veya L858R); NMD = Mutasyon Saptanmadı (ekzon 19 delesyonu ve L858R).

AURA2

Birincil etkililik uç nokta değişkeni, yanıt için değerlendirilebilir analiz seti kullanılarak BICR tarafından RECIST 1.1'e göre objektif yanıt oranıdır (ORR). ORR, en az bir ziyarette bulunan ve en az dört hafta sonra doğrulanan tam yanıt (CR) veya kısmi yanıtın (PR) sonucu olan hastaların sayısı (%) olarak tanımlanmıştır (CR veya PR'nin en iyi objektif yanıtı [BOR]).

Doku Değerlendirilebilir Yanıt Analizi Seti (ERAS) popülasyonunda (en az bir doz TAGRISSO® alan ve başlangıçta BICR'ye göre ölçülebilir hastalığı olan, dokuda **cobas** EGFR Test'te T790M+ olan hastalar) 111 hasta **cobas** EGFR Test ile K2 EDTA plazma T790M+'dır (hem doku hem de plazma örnekleri tarafından T790M+). Bu alt küme için ORR %64,9'dur (72/111, %95 GA: %52,1, %70,4) ve bu, doku ERAS popülasyonunda gözlemlenen %64,1 ORR değerine çok benzerdir.

Doku Tam Analiz Seti (FAS) popülasyonunda (en az bir doz TAGRISSO® alan, dokuda **cobas** EGFR Test ile T790M+ hastalar) 117 hasta, **cobas** EGFR Test ile plazma T790M+'dır. Hem doku hem plazma örnekleri ile T790M+ sonucuna sahip hastalar için ORR %61,5'dir (72/117, %95 GA: %55,2, %73,7) ve bu, doku FAS popülasyonunda gözlemlenen %61 ORR değerine çok benzerdir. Bu analizlerin sonuçları Tablo 41 içinde gösterilmiştir. AURA2'ye katılmanın pozitif doku testi sonuçlarına dayanmasından ötürü (T790M plazma+, T790M doku-) hastalar için sonuç verileri bu çalışmada mevcut değildir.

Tablo 41 AURA2 çalışmasından alınan kayıtlı hastalar arasında (dokuya göre T790M+) plazma sonucuna göre objektif yanıt oranı

Popülasyon (doku örneğiyle T790M+)	Plazma Örneğinden cobas EGFR Test Sonuçları	N	Yanıtı olan Hastaların Sayısı (ORR) ^a n (%)	ORR (%95 GA)
Doku Tam Analiz Seti (Doku FAS)	T790M+ (Plazma FAS)	117	72 (%61,5)	(%55,2, %73,7)
	T790M-	89	53 (%59,6)	(%51,3, %73,0)
	Genel (Doku FAS)	210	128 (%61,0)	(%57,0, %70,8)
Doku Değerlendirilebilir Yanıt Analizi Seti (Doku ERAS)	T790M+ (Plazma ERAS)	111	72 (%64,9)	(%52,1, %70,4)
	T790M-	83	52 (%62,7)	(%48,6, %69,8)
	Genel (Doku ERAS)	198	127 (%64,1)	(%54,0, %67,6)

^a Yanıtlar yalnızca doğrulanmış yanıtları içerir.

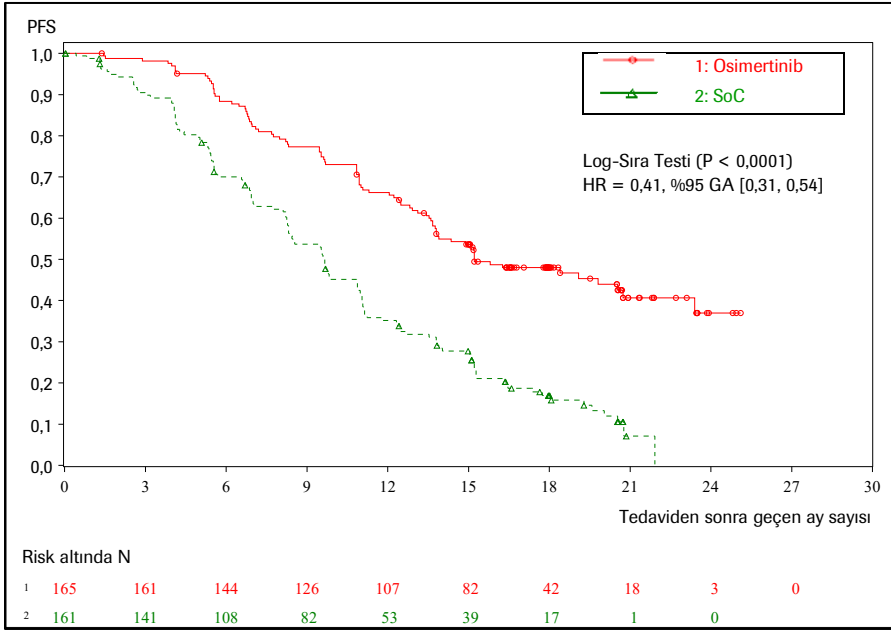
FLAURA

I. TAGRISSO® Birinci Basamak için Faz III Çalışması

FLAURA çalışmasında¹⁰ toplam 994 hasta taranmış olup klinik araştırmaya 556 hasta randomize edilmiştir ve 438 hastanın taraması başarısız olmuştur. 556 randomize FLAURA hastasından 537'si çalışma analizi için uygundur. Çalışmaya uygun 537 hastadan 276'sı merkezi bir **cobas** EGFR doku testi ile randomize edilmiş olup bunların 254'ünde test için mevcut bir K2 EDTA plazma örneği vardır ve 190'ı **cobas** EGFR plazma testi (pEGFRm+) için pozitifdir; 261'i yerel bir doku testi ile randomize edilmiştir ve bunların 242'sinin test için hazır plazma örneği vardır ve 169'u **cobas** EGFR plazma testi için pozitifdir (136 **cobas** doku EGFR mutasyonu pozitif (tEGFRm+), 1'inde **cobas** doku EGFR mutasyonu negatifdir (tEGFRm-) ve 32'si ise geçersizdir/**cobas** doku testi ile test edilmemiştir).

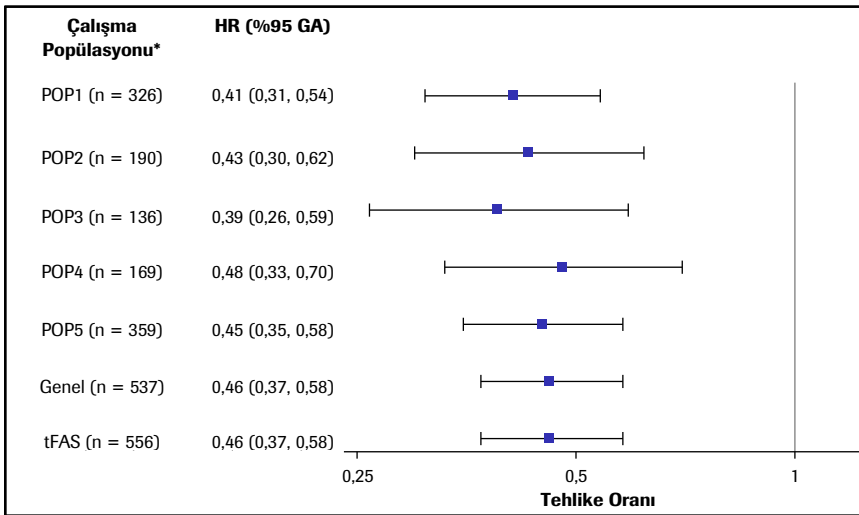
cobas EGFR Test'e göre birincil plazma popülasyonu (tEGFRm+ ve pEGFRm+) için N = 326 olup 190'ı merkezi olarak randomize ve 136'sı ise yerel olarak randomizedir, HR 0,41'dir (%95 GA: 0,31, 0,54) ve FLAURA FAS için HR (tEGFRm+, N = 556) 0,46'dır (%95 GA: 0,37, 0,58). Dolayısıyla, birincil plazma popülasyonu için ilacın etkililiği, FLAURA FAS popülasyonu ile tutarlıdır. Plazma örneğinde ekzon 19 delesyonu veya L858R mutasyonu bulunan birincil plazma popülasyonu için Kaplan Meier grafiği Şekil 17 içinde gösterilmiştir.

Şekil 17 FLAURA birincil plazma popülasyonu için tedavi yoluyla PFS'nin Kaplan-Meier Grafiği (cobas tEGFR+ ve cobas pEGFR+ olan hastalar, n = 326)



Aşağıda Şekil 18 içinde gösterildiği şekilde TAGRISSO®'nun SoC üzerindeki üstünlüğü, 0,39 ila 0,48 arasında değişen HR'lerle ve FLAURA FAS popülasyonundan elde edilen HR ile tutarlı (HR = 0,46) olup yerel ve merkezi **cobas** tEGFR kayıt durumu tarafından tanımlanan tüm plazma pozitif alt gruplarda tutarlıdır.

Şekil 18 Yerel ve Merkezi cobas EGFR Test Durumu ile Tanımlanan FLAURA Alt grupları için HR'lerin Forest Grafiği



POP = Popülasyon (alt grup)

* POP1: **cobas** doku testi ve **cobas** plazma testi pozitif olan tüm randomize hastalar.

POP2: **cobas** doku testi ile randomize edilen ve ayrıca **cobas** plazma testi pozitif olan hastalar.

POP3: Yerel doku testi ile randomize edilen ve ayrıca **cobas** doku ve plazma testi pozitif olan hastalar.

POP4: Yerel doku testi ile randomize edilen ve ayrıca **cobas** plazma testi pozitif olan hastalar.

POP5: **cobas** plazma testi pozitif olan tüm randomize hastalar.

Genel: 19 Çinli hasta hariç tüm randomize hastalar.

tFAS: Tüm randomize hastalar (FLAURA tam analiz seti).

II. IRESSA® Bakım Standardı Analizi

IRESSA® (gefitinib) ile tedavi edilen bakım standardı kolundan (SoC) gelen hastalar üzerinde ayrı bir analiz yapılmıştır. FLAURA'da araştırmacı tarafından değerlendirilen objektif yanıt olan IRESSA® ile tedavi edilen tüm hastalar arasından 105 hastada, K2 EDTA örneklerinden alınan **cobas** plazma testi pozitifdir. Tüm **cobas** plazma pozitif hastaları için ORR %71,4'tür (75/105, %95 GA: %62,2, %79,2, Tablo 42 içinde POP4).

cobas plazma testinden pozitif sonuç alan 105 hastadan 47'si **cobas** doku testiyle (**cobas** plazma testi için birincil etkililik popülasyonu) randomize edilmiştir ve 58 hasta ise yerel bir testle randomize edilmiştir. **cobas** plazma testi için birincil etkililik popülasyonunda (n = 47) araştırmacı değerlendirmesine göre toplam 36 hastanın yanıt verdiği kabul edilmiştir ve %76,6'lık bir ORR değeri ile sonuçlanmıştır (%95 GA: %62,8, %86,4, Tablo 42 içinde POP1).

Hem **cobas** doku hem de **cobas** plazma testleri ile pozitif olan yerel randomize edilmiş hastalarda ORR değeri %62,2'dir (28/45, %95 GA: %47,6, %74,9) (Tablo 42 içinde POP2). Hem **cobas** doku hem de **cobas** plazma testleri ile pozitif olan tüm IRESSA® ile tedavi edilen hastalarda ORR değeri %69,6'dır (64/92, %95 GA: %59,5, %78,0) (Tablo 42 içinde POP3). Bu farklı hasta popülasyonları için ORR'lerin Forest grafiği Şekil 19'ünde gösterilmiştir. Sonuçlar, IRESSA®'nın **cobas** plazma testine dayalı tedavi etkisinin her alt popülasyonda korunduğunu ve IRESSA®'da seçilen hastalar için orijinal kayıt çalışmasında (IFUM) bildirilen sonuçlarla tutarlı olduğunu göstermektedir.¹³

Tablo 42 FLAURA'da IRESSA® ile Tedavi Edilen Hastalarda cobas Plazma Pozitif için ORR'ler

Objektif Yanıt	SoC Kolunda IRESSA® ile Tedavi Edilen Plazma Pozitif (pEGFR+) Hastalar				
	pEGFR+ Merkezi olarak Randomize Edilen (cobas tEGFR+)	pEGFR+ Yerel olarak Randomize Edilen (Yerel tEGFR+)			Toplam
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Geçersiz/ Test Edilmedi	
Hasta Sayısı	47	45	1	12	105
Yanıt	36	28	1	10	75
Yanıtsız	11	17	0	2	30
ORR (% , %95 GA)	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)		-	-	-

Not: tEGFR = doku EGFR; pEGFR = plazma EGFR; GA = (skor) güven aralığı.

POP = popülasyon (alt grup)

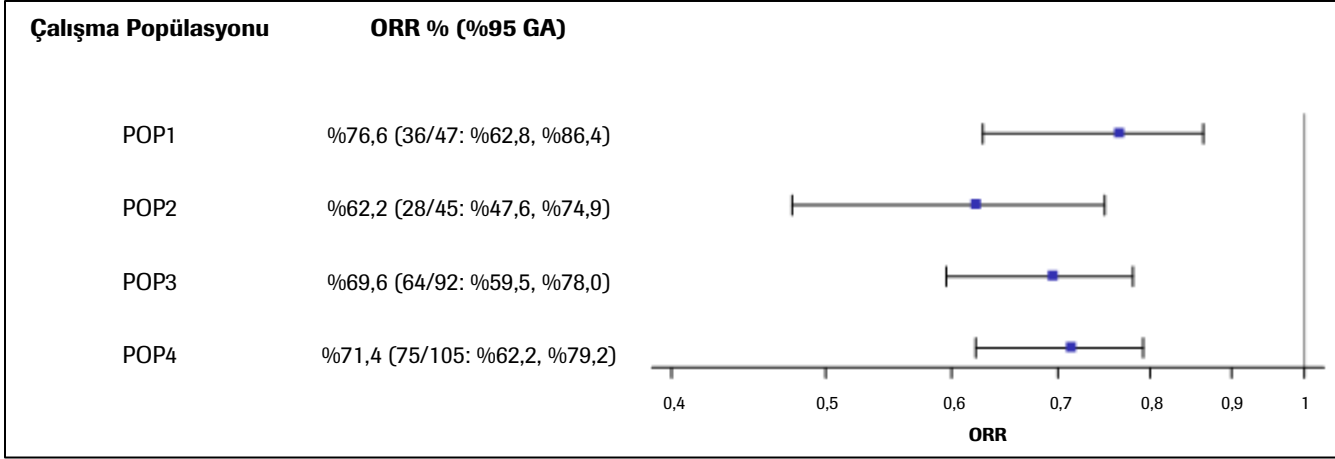
POP1: **cobas** doku testi ile randomize edilen **cobas** pEGFR+ hastalar için ORR (**cobas** plazma testi için birincil etkililik popülasyonu).

POP2: Yerel doku testi ile randomize edilen **cobas** plazma ve doku pozitif hastalar için ORR.

POP3: Tüm **cobas** plazma ve doku pozitif hastalar için ORR.

POP4: Tüm **cobas** plazma pozitif hastalar için ORR.

Şekil 19 Farklı Popülasyonlar için Plazmada cobas EGFR Test'e Dayanan ORR'lerin Forest Grafikleri



POP = popülasyon (alt grup)

POP1: **cobas** doku testi ile randomize edilen **cobas** pEGFR+ hastalar için ORR (**cobas** plazma testi için birincil etkililik popülasyonu).

POP2: Yerel doku testi ile randomize edilen **cobas** plazma ve doku pozitif hastalar için ORR.

POP3: Tüm **cobas** plazma ve doku pozitif hastalar için ORR.

POP4: Tüm **cobas** plazma pozitif hastalar için ORR.

Sonuç işaretleri

Sonuç işaretlerinin açıklaması

Bir işaretin kaynağı, Tablo 43 içinde belirtildiği şekilde işaret kodunda gösterilir.

Tablo 43 İşaret kaynağı

İşaret kodu başlangıcı	İşaret kaynağı	Örnek
M ^a	Birden çok veya diğer nedenler	M6
R	Sonucun yorumlanması	R20
Z ^a	Analizör	Z1

^a cobas® 4800 Sistemi – Kullanım Kılavuzuna veya cobas® 4800 Sistemi – Kullanıcı Yardımına bakın.

Tablo 44 içinde, sistemde kullanıcıya yönelik tüm sonuç işaretleri listelenmiştir.

Tablo 44 Sonuç yorumlama işaretlerinin listesi

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Hata	Hedef saptanamadı	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnek için negatif bir sonucun oluştuğunu belirtir (örnek bir veya daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Hata	Mutant Kontrolü saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Hata	Mutant Kontrolü saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları Mutant Kontrol için negatif bir sonucun meydana geldiğini belirtir. Bir Mutant Kontrol DNA'sı bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir.
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Hata	Mutant Kontrolü aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları Mutant Kontrolü için gözlemlenen bir Ct değerinin, yerleşik eşiğin üzerinde olduğunu gösterir (yani dirsek çok yüksektir). Olası nedenler şunlar olabilir: 1. Çalışma Master Mix'inin yanlış hazırlanması 2. Çalışma Master Mix'ini mikrokuyucuk plakasının bir kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası 3. Mutant Kontrolü mikrokuyucuk plakasının bir kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası.
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Hata	Mutant Kontrolü aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları Mutant Kontrol için gözlemlenen bir Ct değerinin, yerleşik eşiğin altında olduğunu gösterir (yani dirsek çok düşük). Bu hata DNA kontaminasyonu durumunda oluşabilir.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Hata	Negatif Kontrol saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.

İşaret kodu	Önem derecesi	Açıklama	Önerilen işlem
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Hata	Negatif Kontrol aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, Negatif Kontrol için pozitif bir sonuç oluştuğunu gösterir (yani bir kontaminasyon gerçekleşmiştir).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Hata	Hedef saptanamadı	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Hata	Sonuç, aralık dışındadır	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnekte atipik düşük bir Ct değerinin gözlemlendiğini gösterir.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Hata	Sonuç, aralık dışındadır	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnek için Mutant Ct değeri ile İnternal Kontrol Ct değeri arasında atipik bir ilişkinin gözlemlendiğini gösterir.
R811, R831, R851	Hata	İnternal Kontrol saptanamadı	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları dirsek belirleme algoritmasının atipik veya parazitli floresan paterni olması durumunda meydana gelebilecek bir hatayla karşılaştığını gösterir.
R812, R832, R852	Hata	İnternal Kontrol saptanamadı	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnek için İnternal Kontrol sonucunun geçerli olmadığını gösterir. Geçerli bir İnternal Kontrol sonucunun olmaması aşağıdakileri gösterir: 1. Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür 2. İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir 3. Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır 4. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar İnternal Kontrol primerleriyle ve/veya problemlerle kapatılmıştır 5. Örnek DNA bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir 6. Diğer faktörler.
R813, R834, R853	Hata	İnternal Kontrol aralık dışındadır	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnek için İnternal Kontrol sonucunun geçerli olmadığını gösterir. Geçerli bir İnternal Kontrol sonucunun olmaması aşağıdakileri gösterir: 1. Örnekten alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. 2. İşleme alınan örnek miktarı yetersizdir. 3. Örnek içinde PCR inhibitörleri vardır. 4. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar İnternal Kontrol primerleriyle ve/veya problemlerle kapatılmıştır 5. Örnek DNA bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir. 6. Diğer faktörler.
R814, R835, R854	Hata	İnternal Kontrol aralık dışındadır	Örneği tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, örnekte atipik düşük bir İnternal Kontrol Ct değerinin gözlemlendiğini gösterir. Bu hata, PCR karışımının konsantre genomik DNA ile aşırı yüklenmesi durumunda ortaya çıkabilir.

Ek bilgiler

Semboller

Aşağıdaki semboller Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılır.

Tablo 45 Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılan semboller

Age/DOB Yaş veya doğum tarihi	Hasta yanında test için uygun olmayan cihaz	QS IU/PCR PCR reaksiyonu başına QS IU, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS ulusal birimlerini (IU) kullanın.
Yardımcı yazılım	Kendi kendine test için uygun olmayan cihaz	SN Seri numarası
Assigned Range [copies/mL] Atanan aralık (kopya/mL)	Distribütör (Not: Sembolün altında geçerli ülke/bölge belirtilmiş olabilir)	Site Tesis
Assigned Range [IU/mL] Atanan aralık (IU/mL)	Tekrar kullanmayın	Procedure Standard Standart prosedür
EC REP Avrupa Topluluğundaki yetkili temsilci	Kadın	STERILE EO Etilen oksit ile sterilize edilmiştir
BARCODE Barkod Veri Sayfası	Sadece IVD performans değerlendirmesi için	Karanlık ortamda muhafaza edin
LOT Seri kodu	GTIN Küresel ticaret ürün numarası	Sıcaklık sınırı
Biyolojik riskler	İthalatçı	Test tanım dosyası
REF Katalog numarası	IVD <i>In vitro</i> Tıbbi Tanı cihazı	Burası yukarı gelecek
CE uygunluk işareti; bu cihaz, <i>in vitro</i> tıbbi tanı cihazı için geçerli CE işareti gerekliliklerine uygundur	LLR Belirlenen aralığın alt limiti	Procedure UltraSensitive Ultra hassas prosedür
Collect Date Numune alma tarihi	Erkek	UDI Benzersiz cihaz tanımlayıcı
Kullanım talimatlarına bakın	Üretici	ULR Belirlenen aralığın üst limiti
<n> test için yeterli miktarda içerir	CONTROL - Negatif kontrol	Urine Fill Line İdrar dolum çizgisi
CONTENT Kit içeriği	Steril değil	Rx Only Yalnızca ABD: Federal yasalar, bu cihazın yalnızca bir hekim tarafından veya hekimin siparişiyle satışına izin verir.
CONTROL Kontrol	Hasta adı	Son kullanma tarihi
Üretim tarihi	Hasta numarası	
Hasta yanında test için uygun cihaz	Buradan soyarak açın	
Kendi kendine test için uygun cihaz	CONTROL + Pozitif kontrol	
	QS copies / PCR PCR reaksiyonu başına QS kopya, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS kopyalarını kullanın.	

Teknik destek

Teknik destek için lütfen yerel bağlı şirket ile iletişime geçin:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Üretici

Tablo 46 Üretici

Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilmiştir



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

ABD'de imal edilir

Ticari markalar ve patentler

Bkz. <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Telif hakkı

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.

Referanslar

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, 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.

Belge revizyonu

Belge revizyonu bilgileri	
Doc Rev. 8.0 07/2023	Bölüm A ve Bölüm B 'deki Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar bölümünde Sistem Yazılımı sürümü 2.2'ye güncellenmiştir ve Ürün Bilgi Kartına ilişkin bir not eklenmiştir. cobas® markası güncellenmiştir. Bağlantı da dahil olmak üzere Ticari markalar ve patentler bölümü güncellenmiştir. Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche Temsilciniz ile iletişime geçin.