

cobas[®] EGFR Mutation Test v2

For bruk til *in vitro*-diagnostikk



cobas[®] EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

For FFPET-prøver kan du se **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) for prøvepreparering.

For plasmaprøver kan du se **cobas[®]** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) for prøvepreparering.

INNHOLDSFORTEGNELSE

Tiltenkt bruk	6
Oppsummering og forklaring av testen.....	7
Bakgrunn	7
Testprinsipper.....	9
Prøvepreparering.....	9
PCR-amplifikasjon	9
AVSNITT A: FOR BRUK MED VEVSPRØVER.....	11
Materiell og reagenser	11
Materiell og reagenser som medfølger	11
Oppbevaring og håndtering av reagenser.....	12
Ytterligere materiell som kreves.....	13
Instrumentering og programvare som kreves, men som ikke medfølger	13
Krav til oppbevaring og håndtering.....	14
Advarsler og forholdsregler	14
God laboratoriepraksis	14
Kontaminering.....	14
Integritet	15
Kassering	15
Søl og rengjøring	15
Prøvetaking, -transport og -oppbevaring	15
Prøvetaking	15
Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver.....	15
Stabilitet ved oppbevaring av behandlede prøver.....	16
Testprosedyre	17
Testkjøring	17
Bruksanvisning	17
Størrelse på analyseserier	17
Full prosesskontroll.....	17
DNA-isolering	17
Makrodisseksjon.....	18
DNA-kvantitering	18
Amplifikasjon og deteksjon	18
Klargjøring av instrumentet.....	18
Klargjøring av testrekkefølge.....	19
Kalkulering av fortynning av prøve-DNA-konsentrat	20
Prøvefortynning	20

Klargjøring av reaksjoner	21
Starte PCR	22
Resultater	23
Tolkning av resultater	23
Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater	23
Kvalitetskontroll og gyldighet av resultater	24
Mutantkontroll	24
Negativ kontroll	24
Testens begrensninger	24
Evaluering av analytisk ytelse	25
Analytisk sensitivitet – blankgrense	25
Deteksjonsgrense ved bruk av FFPET-prøveblandinger	25
Minimum tumorinnhold	27
Kryssreaktivitet til andre mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21	28
Prøver fra den kliniske EURTAC-studien	28
Prøver fra den kliniske AURA2-studien	28
Spesifisitet – mikroorganismer og EGFR-homologer	28
Lungerelaterte mikroorganismer	28
Plasmider av EGFR-homologer	28
Interferens	29
Nekrotisk vev	29
Repeterbarhet	29
Prøvehåndtering og reproducerbarhet	29
Evaluering av klinisk ytelse	30
Klinisk reproducerbarhetsstudie 1	30
Klinisk reproducerbarhetsstudie 2	31
Korrelasjon til referansem metode ved bruk av Fase III-prøver fra EURTAC-studien	32
Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase II-prøver fra AURA2	34
Kliniske resultater	35
EURTAC	35
AURA2	36
FLAURA	37

AVSNITT B: FOR BRUK MED PLASMAPRØVER	41
Prøvepreparering	41
Materiell og reagenser	41
Materiell og reagenser som medfølger	41
Oppbevaring og håndtering av reagenser	42
Ytterligere materiell som kreves	43
Instrumentering og programvare som kreves, men som ikke medfølger	43
Krav til oppbevaring og håndtering	43
Advarsler og forholdsregler	43
God laboratoriepraksis	44
Kontaminering	44
Integritet	44
Kassering	45
Søl og rengjøring	45
Prøvetaking, -transport og -oppbevaring	45
Prøvetaking og -håndtering	45
Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver	46
Stabilitet ved oppbevaring av behandlede prøver	46
Testprosedyre	47
Testkjøring	47
Bruksanvisning	47
Størrelse på analyseserier	47
Full prosesskontroll	47
DNA-isolering	47
Amplifikasjon og deteksjon	48
Klargjøring av instrumentet	48
Klargjøring av testrekkefølge	48
Klargjøring av reaksjoner	49
Starte PCR	50
Resultater	51
Tolkning av resultater	51
Semikvantitativ indeks (SQI)	51
Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater	52
Kvalitetskontroll og gyldighet av resultater	52
Mutantkontroll	52
Negativ kontroll	52
Testens begrensninger	52

Evaluering av analytisk ytelse	54
Analytisk ytelse	54
Analytisk sensitivitet – blankgrense	54
Deteksjonsgrense ved bruk av cellelinje-DNA.....	54
Kryssreaktivitet til andre mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21.....	55
Prøver fra AURA-forlengelsesstudien og den kliniske AURA2-studien	55
Spesifisitet – mikroorganisme	55
Interferens	55
Linearitet.....	56
Repeterbarhet.....	59
Evaluering av klinisk ytelse.....	60
Klinisk reproduserbarhet med K2 EDTA-plasma	60
Klinisk reproduserbarhet med Roche cfDNA-plasma.....	61
Deteksjonsgrense (LoD) ved bruk av NSCLC-plasmaprøver	62
Korrelasjon mellom Roche cfDNA-plasma og K2 EDTA-plasma	63
Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase III-plasmaprøver fra ASPIRATION-kohorten	64
Korrelasjon mellom plasma- og vevsprøver med cobas EGFR-testen for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjoner ved bruk av fase III-prøver fra ENSURE	65
Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase II-prøver fra AURA2.....	66
Korrelasjon mellom plasma- og vevsprøver for deteksjon av T790M ved bruk av fase II-prøver fra AURA2...	67
Kliniske resultater.....	68
ENSURE	68
AURA2.....	70
FLAURA.....	70
Resultatflagg	74
Forklaring av resultatflagg.....	74
Tilleggsinformasjon	76
Symboler.....	76
Teknisk support.....	77
Produsent	77
Varemerker og patenter	77
Copyright.....	77
Referanser.....	78
Dokumentrevisjon	80

Tiltenkt bruk

cobas® EGFR-mutasjonstest v2 er en sanntids PCR-test for kvalitativ deteksjon av definerte mutasjoner i det epidermale vekstfaktorreseptorgenet (EGFR) hos pasienter med ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Definerte EGFR-mutasjoner detekteres ved hjelp av DNA isolert fra formalinfiksert, parafininnstøpt tumorvev (FFPET) eller fritt sirkulerende tumor-DNA (cfDNA) fra plasma derivert fra EDTA-antikoagulert perifert fullblod.

Testen er indisert som en ledsagende diagnostisk test for utvelgelse av pasienter med NSCLC for behandling med EGFR-tyrosinkinasehemmere (inkludert de målrettede terapiene som er oppført i Tabell 1 nedenfor) i samsvar med godkjent terapeutisk produktmerking:

Tabell 1

Medikament	FFPET	Plasma
TARCEVA® (erlotinib)	Ekson 19-delesjoner og L858R	Ekson 19-delesjoner og L858R
TAGRISSO® (osimertinib)	Ekson 19-delesjoner, L858R og T790M	Ekson 19-delesjoner, L858R og T790M
IRESSA® (gefitinib)	Ekson 19-delesjoner og L858R	Ekson 19-delesjoner og L858R

Testing av plasmaprøver er mest hensiktsmessig for å vurdere pasienter som det ikke er mulig å ta en tumorbiopsi fra. Pasienter som tester negativt for disse mutasjonene med denne testen ved bruk av plasmaprøver, skal henvises til rutinemessig vevsbiopsi og testing for EGFR-mutasjoner med FFPET-prøvetypen hvis tilgjengelig.

Medikamentsikkerhet og -effekt er ikke fastslått for de følgende EGFR-mutasjonene som også detekteres med **cobas®** EGFR-mutasjonstest v2:

Tabell 2

Medikament	FFPET	Plasma
TARCEVA® (erlotinib)	G719X, ekson 20-innskudd, T790M, S768I og L861Q	G719X, ekson 20-innskudd, T790M, S768I og L861Q
TAGRISSO® (osimertinib)	G719X, ekson 20-innskudd, S768I og L861Q	G719X, ekson 20-innskudd, S768I og L861Q
IRESSA® (gefitinib)	G719X, ekson 20-innskudd, T790M, S768I og L861Q	G719X, ekson 20-innskudd, T790M, S768I og L861Q

cobas® EGFR mutasjonstest v2 for bruk med plasma inkluderer en semikvantitativ måling av mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21 i EGFR-genet. Denne målingen, som rapporteres som en semikvantitativ indeks (SQI), korrelerer med mengden målmutant-cfDNA i plasma og kan brukes til å bestemme endringer i mengden målmutant-cfDNA over tid for en gitt pasient.

Ved manuell prøvepreparering blir FFPET-prøver behandlet ved bruk av **cobas®** DNA Sample Preparation Kit, og plasmaprøver blir behandlet ved bruk av **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit. **cobas®** z 480-analysatoren brukes til automatisert amplifikasjon og deteksjon.

Oppsummering og forklaring av testen

Bakgrunn

Aktiverende mutasjoner i genet som koder for EGFR, forekommer primært i NSCLC, og fører til konstant aktivering av kinaseaktiviteten til EGFR-proteinet, noe som bidrar til den onkogene prosessen.¹ Forekomsten av slike mutasjoner i uselekterte tilfeller av NSCLC er ca. 10–30 %.^{2,3} Slike mutasjoner forekommer imidlertid oftere, men ikke utelukkende, hos kvinnelige pasienter av asiatisk opprinnelse som ikke røyker, eller som røyker lite, og som har en histologi med adenokarsinom.⁴

De vanligste EGFR-mutasjonene ved NSCLC omfatter forskjellige delesjoner i ekson 19 og substitusjonsmutasjonen L858R i ekson 21. Disse mutasjonene utgjør til sammen ca. 85 % av EGFR-mutasjoner observert ved NSCLC.⁵

cobas® EGFR-mutasjonstest v2 (**cobas** EGFR-testen) er en sanntids PCR-analyse som brukes til å detektere G719X-substitusjonsmutasjoner i ekson 18, delesjonsmutasjoner i ekson 19, T790M- og S768I-substitusjonsmutasjoner i ekson 20, innskuddsmutasjoner i ekson 20 samt L858R- og L861Q-substitusjonsmutasjoner i ekson 21.

cobas EGFR-testen brukes som en ledsagende diagnostisk test for TARCEVA® (erlotinib), et medikament som reversibelt hemmer kinaseaktiviteten i EGFR ved å hindre autofosforylering av tyrosingrunder assosiert med reseptoren og således hemme videre nedstrømssignalerende som fremmer celleoverlevelse og -proliferasjon. TARCEVA® bindingsaffinitet for EGFR ekson 19-delesjon eller L858R-mutasjoner i ekson 21 er høyere enn affiniteten for villtypereseptoren.⁶ Kliniske studier har vist at pasienter med fremskreden NSCLC og med delesjonsmutasjoner i ekson 19 eller L858R-substitusjonsmutasjoner i ekson 21, og som ble behandlet med TARCEVA® som førstelinjebehandling, sannsynligvis vil ha bedre klinisk nytte enn pasienter behandlet med kjemoterapi.^{3,7}

cobas EGFR-testen brukes som en ledsagende diagnostisk test for TAGRISSO® (osimertinib), en irreversibel hemmer av både EGFR TKI-sensitiverende mutasjoner og T790M-resistensmutasjoner ved fremskreden NSCLC. TAGRISSO® hemmer kinaseaktiviteten i EGFR, som hemmer en strøm av intracellulære nedstrøms signalerende hendelser som fremmer celleproliferasjon, celleoverlevelse og angiogenese.⁸ Kliniske studier har vist at pasienter med fremskreden ikke-skvamøs NSCLC med en EGFR TKI-sensitiverende mutasjon som har progrediert etter terapi med en førstegenerasjons EGFR TKI, og som har utviklet en T790M-resistensmutasjon i ekson 20, og som ble behandlet med TAGRISSO® (osimertinib), sannsynligvis vil ha klinisk gevinst.⁹ En klinisk studie i fase III viste at pasienter med fremskreden NSCLC (positive for delesjonsmutasjon i ekson 19 eller L858R-substitusjonsmutasjon i ekson 21) som ble behandlet med TAGRISSO® som førstelinjebehandling, hadde bedre klinisk nytte enn pasienter behandlet med en førstegenerasjons EGFR TKI (gefitinib eller erlotinib).¹⁰

cobas EGFR-testen brukes som en ledsagende diagnostisk test for IRESSA® (gefitinib), et medikament som reversibelt hemmer kinaseaktiviteten i EGFR ved å hindre autofosforylering av tyrosingrunder assosiert med reseptoren og således hemme videre nedstrømssignalerende som fremmer celleoverlevelse og -proliferasjon. Kliniske studier har vist at pasienter med fremskreden NSCLC og med delesjonsmutasjoner i ekson 19 eller L858R-substitusjonsmutasjoner i ekson 21, og som ble behandlet med IRESSA® som førstelinjebehandling, sannsynligvis vil ha bedre klinisk nytte enn pasienter behandlet med kjemoterapi.^{11, 12, 13}

Tabell 3 viser en liste over EGFR-mutasjoner som detekteres med **cobas** EGFR-testen.

Tabell 3 cobas EGFR-testen er utformet for å detektere følgende mutasjoner

Ekson	EGFR-mutasjonsgruppe	EGFR-nukleinsyresekvens	HGVS*-nomenklatur for proteiner	HGVS*-nomenklatur for nukleotider	COSMIC-ID ¹⁴
Ekson 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
Ekson 19	Ex19Del	2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2251delTTAAGAGAAGCAA	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
Ekson 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
Ekson 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

Testprinsipper

cobas EGFR-testen er basert på to hovedprosesser: (1) manuell prøvepreparering for å ekstrahere DNA fra FFPET eller plasma; og (2) PCR-amplifikasjon og deteksjon av mål-DNA ved bruk av komplementære primerpar og oligonukleotidprober merket med fluoroforer. **cobas** EGFR-testen er utformet for å detektere følgende mutasjoner:

- Ekson 18: G719X (G719A, G719C og G719S)
- Ekson 19: delesjoner og komplekse mutasjoner (definert som kombinasjonen av en delesjon og et innskudd)
- Ekson 20: S768I, T790M og innskudd
- Ekson 21: L858R og L861Q

Mutasjon detekteres ved hjelp av PCR-analyse med **cobas**® z 480-analysatoren. En mutantkontroll og en negativ kontroll er inkludert i hver analyseserie for å bekrefte gyldigheten av analyseserien.

Prøvepreparering

cobas® DNA Sample Preparation Kit og **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit er for manuell prøvepreparering fra henholdsvis FFPET og plasma, basert på nukleinsyrebinding til glassfibre. En protease og kaotropisk lyserings-/bindingsbuffer frigjør nukleinsyrer og beskytter det frigjorte DNA-et mot DNaser. Deretter tilsettes isopropanol til lyseringsblandingen, som så sentrifugeres gjennom en kolonne med et glassfiberfilter. Under sentrifugering bindes DNA-et til glassfiberfilterets overflate. Ubundne substanser, slik som salter, proteiner og andre cellulære forurensninger, fjernes under sentrifugeringen. De adsorberte nukleinsyrene vaskes og elueres deretter med en vandig løsning. Mål-DNA-et blir deretter amplifisert og detektert i **cobas**® z 480-analysatoren ved bruk av amplifikasjons- og deteksjonsreagensene som følger med **cobas** EGFR-testkitet.

PCR-amplifikasjon

Valg av mål

cobas EGFR-testen bruker primere som definerer spesifikke baseparsekvenser for hver av mutasjonene som testen er rettet mot. For delesjonsmutasjonene i ekson 19 er målregionene sekvenser i størrelsesorden 125–141 basepar; for L858R-substitusjonsmutasjonen i ekson 21 er målregionen en 138-baseparsekvens; for T790M-substitusjonsmutasjonen i ekson 20 er målregionen en 118-baseparsekvens; for G719X-substitusjonsmutasjonen i ekson 18 er målregionene sekvenser i størrelsesorden 104–106 basepar; for S768I-substitusjonsmutasjonen i ekson 20 er målregionen en 133-baseparsekvens; for innskuddsmutasjonene i ekson 20 er målregionene sekvenser i størrelsesorden 125–143 basepar; for L861Q-substitusjonsmutasjonen i ekson 21 er målregionen en 129-baseparsekvens. Amplifikasjonen skjer kun i de regionene i EGFR-genet som ligger mellom primerne. Hele EGFR-genet amplifiseres ikke.

Målamplifikasjon

Et derivat av *Thermus* species Z05-AS1 DNA-polymerase brukes til målamplifikasjon. PCR-blandingen varmes først opp for å denaturere DNA-et og eksponere primermålsekvensene. Når blandingen kjøles ned, hybridiseres oppstrøms- og nedstrømsprimere til mål-DNA-sekvensene. I nærvær av divalent metallkation og dNTP i overskudd forlenger Z05 DNA-polymerasen hver hybridiserte primer, og en ny DNA-tråd syntetiseres. Dette avslutter den første PCR-syklusen, og gir en dobbelttrådet DNA-kopi som inkluderer basepar-målregionene av EGFR-genet. Denne prosessen gjentas i et bestemt antall sykluser, der hver syklus effektivt doubler mengden amplikon-DNA.

Automatisk sanntidsdeteksjon av mutasjon

cobas EGFR-testen anvender sanntids PCR-teknologi. Hver målspesifikke oligonukleotidprobe i reaksjonen er merket med et rapporteringsfluorofor og et slukkerfluorofor, som absorberer (slukker) fluorescensutstrålingene fra rapporteringsfluoroforet i en intakt probe. Under hver amplifikasjonssyklus bindes proben som er komplementær til den enkelttrådet DNA-sekvensen i amplikonet, og blir deretter splittet av 5' til 3'-nukleaseaktiviteten til Z05-AS1 DNA-polymerasen. Så snart rapporteringsfluoroforet er separert fra slukkerfluoroforet av denne nukleaseaktiviteten, kan fluorescens med en karakteristisk bølgelengde måles når rapporteringsfluoroforet eksiteres av riktig lysspektrum. Fire ulike rapporteringsfluoroforer brukes til å merke mutasjonene som er målet for testen. Amplifikasjon av de sju EGFR-sekvensene som er målet for testen, detekteres uavhengig over tre reaksjoner ved å måle fluorescensen ved de fire karakteristiske bølgelengdene i dedikerte optiske kanaler.

Selektiv amplifikasjon

Selektiv amplifikasjon av målnukleinsyre fra prøven oppnås i **cobas** EGFR-testen ved bruk av AmpErase-enzymet (uracil-N-glykosylase) og deoksyuridintrifosfat (dUTP).¹⁵ AmpErase-enzymet gjenkjenner og katalyserer destruksjon av DNA-tråder som inneholder deoksyuridin, men ikke DNA som inneholder tymidin. Deoksyuridin finnes ikke i naturlig forekommende DNA, men finnes alltid i amplikon på grunn av bruken av dUTP i stedet for deoksytymidin-trifosfat som en av nukleotidtrifosfatene i Master Mix-reagensene. Det er derfor kun amplikon som inneholder deoksyuridin. Deoksyuridin gjør kontaminerende amplikon mottakelig for destruksjon ved hjelp av AmpErase-enzymet forut for amplifikasjon av mål-DNA. AmpErase-enzymet, som inngår i Master Mix-reagensene, katalyserer nedbrytningen av DNA som inneholder deoksyuridin, ved å bryte deoksyuridiningruppens deoksyribosekjede ved C1-posisjonen. Ved temperaturøkning i det første varmetrinnet ved alkalisk pH brytes amplikon-DNA-kjeden der deoksyuridinet finnes, noe som igjen fører til at DNA ikke lenger er amplifiserbart. AmpErase-enzymet er inaktivt ved temperaturer over 55 °C, dvs. gjennom alle termosykliske trinn, og derfor blir ikke målamplikon ødelagt. **cobas** EGFR-testen har vist seg å kunne deaktivere deoksyuridinholdig EGFR-mutantamplikon.

FØLG INSTRUKSJONENE I AVSNITT A FOR BRUK MED VEVSPRØVER.

FØLG INSTRUKSJONENE I AVSNITT B FOR BRUK MED PLASMAPRØVER.

AVSNITT A: FOR BRUK MED VEVSPRØVER

Se cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) for hvordan DNA isoleres fra vevsprøver.

Materiell og reagenser

Materiell og reagenser som medfølger

Kit/kassetter	Komponenter og reagensingredienser	Antall per test	Sikkerhetssymbol og advarsel
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 tester (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N 06471366001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase)-enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerkede EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N 06471382001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase) enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerkede EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A

Kit/kassetter	Komponenter og reagensingredienser	Antall per test	Sikkerhetssymbol og advarsel
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 tester (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N 07248610001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase) enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerte EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A
	MGAC (Magnesiumacetat) (M/N 05854326001) Magnesiumacetat 0,09 % natriumazid	6 × 0,2 ml	N/A
	EGFR MC (EGFR mutantkontroll) (M/N 06471455001) Tris-buffer EDTA Poly-rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,1 % plasmid-DNA som inneholder EGFR-ekson 18-, 19-, 20- og 21-sekvenser (mikrobiell) < 0,1 % EGFR villtype-DNA (cellekultur)	6 × 0,1 ml	N/A
	DNA SD (DNA-fortynningsløsning) (M/N 05854474001) Tris-HCl-buffer 0,09 % natriumazid	2 × 3,5 ml	N/A

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Reagens	Oppbevaringstemperatur	Oppbevaringstid
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2 °C til 8 °C	Etter åpning er reagensene stabile for bruk opptil 4 ganger over 90 dager eller til angitt utløpsdato, avhengig av hva som kommer først.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** og Working Master Mix (tillages ved tilsetning av **MGAC** til **EGFR MMX-1** eller **EGFR MMX-2** eller **EGFR MMX-3 v2**) skal beskyttes mot langvarig eksponering for lys. Working Master Mix skal oppbevares mørkt ved 2 °C til 8 °C. Preparerte prøver og kontroller må tilsettes innen 1 time fra tidspunktet Working Master Mix ble tillaget. Amplifikasjon må startes innen 1 time fra tidspunktet for tilsetning av de behandlede prøvene og kontrollene i Working Master Mix.

Ytterligere materiell som kreves

Materiell	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Blekemiddel	Forskjellige leverandører
70 % etanol	Forskjellige leverandører
Mikrobrønnplate (AD-plate) og forseglingsfilm for cobas® 4800-systemet	Roche 05232724001
Forseglingsfilmapplikator for cobas® 4800-systemet (leveres med cobas® 4800-systemet)	Roche 04900383001
Justerbare pipetter* (kan pipettere 5–1000 µl)	Forskjellige leverandører
Aerosolbarriere eller “positive displacement” DNase-frie spisser	Forskjellige leverandører
Mikrosentrifugerør med låsbart lokk (1,5 ml sterile, RNase/DNase-frie, PCR-kvalitet)	Forskjellige leverandører
Stativer for mikrosentrifugerør	Forskjellige leverandører
Spektrofotometer for måling av DNA-konsentrasjon*	Forskjellige leverandører
Vortexmikser*	Forskjellige leverandører
Engangshansker, puddefrie	Forskjellige leverandører
Fryser med oppbevaring ved –25 til –15 °C	Forskjellige leverandører

* Alt utstyr må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner.

Hvis du ønsker mer informasjon om materiell som selges separat, kan du ta kontakt med din lokale Roche-representant.

Instrumentering og programvare som kreves, men som ikke medfølger

Nødvendig instrumentering og programvare som ikke medfølger
cobas® z 480-analysator
cobas® 4800-systemets kontrollenhet med systemprogramvareversjon 2.2 eller nyere
EGFR Tissue P1 vevsanalysepakke, programvareversjon 1.0 eller nyere*
Strekkodeleser USB-utg.
Skriver

* Se produktinformasjonskortet for **cobas®** EGFR Mutation Test v2 kit (M/N: 07335873001) for gjeldende programvareversjon.

Hvis du ønsker mer informasjon om materiell som selges separat, kan du ta kontakt med din lokale Roche-representant.

Krav til oppbevaring og håndtering

Advarsler og forholdsregler

Som med alle laboratorieprosedyrer er god laboratoriepraksis essensielt for å sikre optimal ytelse for denne analysen.

- Kun for bruk til *in vitro*-diagnostikk.
- Sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig fra ditt lokale Roche kontor etter forespørsel.
- Denne testen skal brukes til FFPET NSCLC-prøver. Prøver må håndteres som potensielt infeksiose, og sikre laborierutiner må følges. Disse er beskrevet i Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ og i CLSI-dokumentet M29-A4.¹⁷
- Bruk av sterile engangspipetter og DNase-frie pipettespisser anbefales.

God laboratoriepraksis

- Ikke pipetter med munnen.
- Ikke spis, drikk eller røyk i laboratoriets arbeidsområder.
- Vask hendene nøye etter håndtering av prøver og reagenser.
- Bruk vernebriller, laboratoriefrakk og engangshansker ved håndtering av reagenser. Unngå kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Skyll umiddelbart med store mengder vann hvis slik kontakt oppstår. Hvis kontaktstedet ikke blir behandlet, kan det oppstå brannskade. Fortynn med vann før du tørker opp eventuelt søl.
- Rengjør og desinfiser alle arbeidsoverflater nøye med en nylaget løsning av 0,5 % natriumhypokloritt i destillert eller de-ionisert vann (fortynn klor til husholdningsbruk i forholdet 1:10). Tørk deretter av overflaten med 70 % etanol.

Merk: *Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortynning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.*

Kontaminering

- Hansker må brukes, og de må byttes mellom håndtering av prøver og **cobas** EGFR-testreagenser for å unngå kontaminering. Unngå kontaminering av hanskene når prøver håndteres.
- Hansker må byttes ofte for å redusere risiko for kontaminering.
- Hansker må byttes før DNA-isoleringsområder forlates, eller hvis det er mistanke om kontakt med løsninger eller en prøve.
- Unngå mikrobiell kontaminering og ribonukleasekontaminering av reagenser.
- Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. Forbruksmateriell og utstyr skal være dedikert for hver preamplifikasjonsaktivitet og skal ikke brukes til andre aktiviteter eller flyttes mellom områdene. For eksempel må pipetter og forbruksmateriell som brukes til DNA-isolering ikke brukes til å klargjøre reagenser for amplifikasjon og deteksjon.
- Det anbefales sterkt at arbeidsflyten på laboratoriet er unidireksjonal, dvs. at man avslutter en aktivitet før man går videre til neste aktivitet. For eksempel skal DNA-isolering være fullført før du begynner med amplifikasjon og deteksjon. DNA-isolering skal utføres i et annet område enn amplifikasjon og deteksjon. For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal arbeidsområdet for amplifikasjon og deteksjon rengjøres grundig før tillaging av Working Master Mix.

Integritet

- Kit må ikke brukes etter utløpsdatoen.
- Reagenser fra ulike kit eller lot må ikke slås sammen.
- Bruk ikke forbruksmateriell etter utløpsdato.
- Alt forbruksmateriell er laget for bare å brukes én gang. Skal ikke gjenbrukes.
- Alt utstyr må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner.

Kassering

- **MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC og DNA SD** inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberør og danne svært eksplosive metallazider. Hvis løsninger som inneholder natriumazid, helles ned i avløp i laboratoriet, må de skylles ned med store mengder kaldt vann for å unngå opphopning av azider.
- Kast ubrukte reagenser og avfall i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk.

Søl og rengjøring

- Hvis det søles på **cobas® 4800**-instrumentet, må det rengjøres i samsvar med instruksjonene i operatørmanualen for det relevante **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet.
- Bruk ikke natriumhypoklorittløsning (klormiddel) til å rengjøre **cobas® z 480**-analysatoren. Rengjør **cobas® z 480**-analysatoren i samsvar med prosedyrene som er beskrevet i operatørmanualen for det relevante **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet.
- For ytterligere advarsler, forholdsregler og prosedyrer for å redusere risikoen for kontaminasjon av **cobas® z 480**-analysatoren henvises det til operatørmanualen for **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet.

Prøvetaking, -transport og -oppbevaring

Merk: Alle prøver må behandles som om de er potensielt smittebærende.

Prøvetaking

NSCLC FFPET-prøver er validert for bruk med **cobas** EGFR-testen.

Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver

NSCLC FFPET-prøver kan transporteres ved 15 °C til 30 °C. Transport av FFPET-prøver må skje i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk for transport av biologisk materiale.¹⁸

Stabiliteten til FFPET-prøver som oppbevares ved 15 °C til 30 °C i opptil 12 måneder etter prøvetakingsdato, er bekreftet. 5 µm-snitt montert på objektglass kan oppbevares ved 15 °C til 30 °C i opptil 60 dager.

FFPET-prøver er stabile i enten:

FFPET-prøvetype	FFPET-blokk	5 µm FFPET-snitt
Oppbevaringstemperatur for FFPET-prøver	15 °C til 30 °C	15 °C til 30 °C
Oppbevaringstid	Opptil 12 måneder	Opptil 60 dager

Stabilitet ved oppbevaring av behandlede prøver

Behandlede prøver (ekstrahert DNA) er stabile i:

Oppbevaringstemperatur for ekstrahert DNA	-15 °C til -25 °C	2 °C til 8 °C	15 °C til 30 °C
Oppbevaringstid	Opptil 3 fryse-tine-sykluser over 60 dager	Opptil 14 dager	Opptil 1 dag

Ekstrahert DNA skal brukes innenfor den anbefalte oppbevaringsperioden eller før utløpsdatoen til **cobas®** DNA Sample Preparation Kit som brukes til å ekstrahere DNA-et, avhengig av hva som kommer først.

Testprosedyre

Testkjøring

Figur 1 Arbeidsflyt for cobas EGFR-testen med cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Start systemet.
2	Utfør instrumentvedlikehold.
3	Ta ut prøver og reagenser fra lager.
4	Deparafiniser prøver.
5	Utfør DNA-isolering.
6	Eluer DNA.
7	Opprett arbeidsbestilling og skriv ut plateoppsett.
8	Klargjør amplifikasjonsreagenser.
9	Fyll AD-plate med amplifikasjonsreagenser.
10	Fyll AD-plate med prøve.
11	Forsegl AD-plate.
12	Last inn AD-plate i cobas® z 480 -analysator.
13	Start analyseserien.
14	Gjennomgå resultater.
15	Med LIS: send resultater til LIS-systemet.
16	Last ut av analysatoren.

Bruksanvisning

Merk: Kun NSCLC FFPET-snitt med en tykkelse på 5 µm og minst 10 % tumorinnhold per område skal brukes i **cobas** EGFR-testen. Prøver med mindre enn 10 % tumorinnhold per område skal makrodissekteres etter deparafinering.

Merk: Se operatørmanualen for **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet for en detaljert bruksanvisning for **cobas® z 480**-analysatoren.

Størrelse på analyseserier

En enkel analyseserie kan inkludere fra 1 til 30 prøver (pluss kontroller) per 96-brønns mikrobrennplate. Ved analyse av mer enn 24 prøver, må det brukes flere **cobas** EGFR-testkit.

cobas EGFR-testen inneholder tilstrekkelig med reagenser for 8 analyseserier av 3 prøver (pluss kontroller) for maksimalt 24 prøver per kit.

Full prosesskontroll

Denne testen krever en full negativ prosesskontroll. For hver analyseserie skal en negativ kontroll behandles samtidig med prøven(e) fra og med prosedyren for **DNA-isolering**.

DNA-isolering

DNA isoleres fra FFPET-prøver ved bruk av **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Makrodisseksjon

Hvis prøven har mindre enn 10 % tumorinnhold per område, må prøven makrodissekeres som en del av prøveprepareringen.

DNA-kvantitering

Merk: Måling av DNA-konsentrasjonen skal utføres straks etter prosedyren for DNA-isolering, og før oppbevaring.

Merk: Oppbevar DNA-konsentratet i samsvar med instruksjonene i avsnittet **Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver**.

1. Bland hvert DNA-konsentrat ved å vortexe i 5 sekunder.
2. Kvantiter DNA ved hjelp av et spektrofotometer i samsvar med produsentens protokoll. Bruk **DNA EB** fra **cobas®** DNA Sample Preparation Kit som blank for instrumentet. Et gjennomsnitt av to etterfølgende avlesninger er påkrevd. De to målingene skal være innenfor ± 10 % av hverandre når de avleste DNA-konsentrasjonene er $\geq 20,0$ ng/ μ l. For avleste DNA-konsentrasjoner $< 20,0$ ng/ μ l skal de to målingene være innenfor ± 2 ng/ μ l. Hvis de to målingene ikke er innenfor ± 10 % av hverandre når de avleste DNA-konsentrasjonene er $\geq 20,0$ ng/ μ l, eller innenfor ± 2 ng/ μ l når de avleste DNA-konsentrasjonene er $< 20,0$ ng/ μ l, må det tas ytterligere 2 avlesninger før kravene er oppfylt. Gjennomsnittet av disse to nye målingene skal da beregnes.

Merk: DNA-konsentratet fra den behandlede negative kontrollen (**NEG**) trenger ikke måles.

3. Konsentrasjonen til DNA-konsentratet fra prøvene må være ≥ 2 ng/ μ l for at **cobas** EGFR-testen skal kunne utføres. Tre amplifikasjoner/deteksjoner kjøres per prøve, og det benyttes 25 μ l av en 2 ng/ μ l-fortynning av DNA-konsentratet (50 ng DNA totalt) for hver amplifikasjon/deteksjon.

Merk: Hvert DNA-konsentrat må ha en minimumskonsentrasjon på 2 ng/ μ l for at **cobas** EGFR-testen skal kunne utføres. Hvis konsentrasjonen av et DNA-konsentrat er < 2 ng/ μ l, skal prosedyrene for deparafinering, DNA-isolering og DNA-kvantitering gjentas for den aktuelle prøven ved bruk av to FFPET-snitt på 5 μ m. Når det gjelder monterte prøver, etter deparafinering, skal vevet fra begge snittene kombineres i ett rør og nedsenkes i **TLB + PK** fra **cobas®** DNA Sample Preparation Kit. Utfør DNA-isolering og -kvantitering. Når det gjelder umonterte prøver, skal vevet fra begge snittene kombineres i ett rør og deparafinering, DNA-isolering og DNA-kvantitering utføres. Hvis DNA-konsentratet fortsatt er < 2 ng/ μ l, bestill et annet FFPET-prøvesnitt fra det henvisende sykehuset.

Amplifikasjon og deteksjon

Merk: For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal amplifikasjon og deteksjon utføres i et annet område enn der det utføres DNA-isolering. Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. For å sikre tilstrekkelig rengjøring skal alle overflater, inkludert stativ og pipetter, tørkes grundig med en 0,5 % natriumhypoklorittløsning og deretter med en 70 % etanolløsning. Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortynning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.

Klargjøring av instrumentet

Se operatørmanualen for **cobas®** 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas®** 4800-systemet for detaljerte instruksjoner om hvordan **cobas®** z 480-analysatoren konfigureres.

Klargjøring av testrekkefølge

For detaljerte instruksjoner om trinnene i EGFR-arbeidsflyten kan du se operatørmanualen for **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet.

Generer en plateoversikt med posisjonen til alle prøvene og kontrollene i analyseserien. I en analyseserie som kun inneholder vevsprøver, tilsettes mutantkontrollen i posisjon **A01–A03** på platen. Den negative kontrollen tilsettes i posisjon **B01–B03** på platen. Fortynnede prøver tilsettes deretter i sett à 3 kolonner, fra **C01–C03** til og med **H10–H12**, som vist i Figur 2.

cobas EGFR-testen kan kjøres i kombinert analysemodus (f.eks. EGFR-vev med EGFR-plasma). Kontrollposisjonen kan variere avhengig av hvilke analyser som er valgt, og av antall prøver. Se operatørmanualen for **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet for mer informasjon om hvordan du setter opp en kombinert analyseserie.

Figur 2 Plateoppsett for cobas EGFR-testen

Rad / kolonne	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

Der: MC = mutantkontroll, NEG = negativ kontroll, S# = prøve-ID og MMX # tilsvarer Master Mix-reagens 1, 2 eller 3 v2.

Merk: En gitt prøve må fordeles over tre etterfølgende kolonner i én rad for å generere et svar.

Merk: Working Master Mix 1 må tilsettes i kolonne 01, 04, 07 og 10 på platen. Working Master Mix 2 må tilsettes i kolonne 02, 05, 08 og 11 på platen. Working Master Mix 3 v2 må tilsettes i kolonne 03, 06, 09 og 12 på platen.

Merk: Opptil 30 prøver kan tilsettes til én enkelt plate. Hvis det er nødvendig med mer enn ett reagenskit for å behandle alle prøvene på platen, må alle kitene være fra samme lot.

Kalkulering av fortynning av prøve-DNA-konsentrat

Kalkulering av fortynning av prøve-DNA-konsentrater fra 2 ng/μl til 36 ng/μl

Merk: DNA-konsentrater fra prøver skal fortynnes like før amplifikasjon og deteksjon.

Merk: Tre amplifikasjoner/deteksjoner kjøres per prøve, og det benyttes et totalvolum på 75 μl (25 μl hver av tre reaksjoner) av en 2 ng/μl-fortynning av DNA-konsentratet (totalt 150 ng DNA).

1. For hver prøve, beregn volumet (μl) av DNA-konsentrat som trengs:
$$\mu\text{l av DNA-konsentrat} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{konsentrasjon til DNA-konsentratet [ng}/\mu\text{l}]$$
2. For hver prøve må det beregnes hvor stort volum (μl) av **DNA SD** som trengs:
$$\mu\text{l av DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l av DNA-konsentrat}$$

Eksempel:

Konsentrasjon til DNA-konsentratet = 6,5 ng/μl

1. $\mu\text{l av DNA-konsentrat} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$
2. $\mu\text{l av DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$

Kalkulering av fortynning av prøve-DNA-konsentrater > 36 ng/μl

Merk: DNA-konsentrater fra prøver skal fortynnes like før amplifikasjon og deteksjon.

Merk: Tre amplifikasjoner/deteksjoner kjøres per prøve, og det benyttes et totalvolum på 75 μl (25 μl hver av tre reaksjoner) av en 2 ng/μl-fortynning av DNA-konsentratet (totalt 150 ng DNA).

1. For DNA-konsentrater med konsentrasjon > 36 ng/μl, skal følgende formel bruk for å beregne hvor mye **DNA SD** som trengs for å lage minst 90 μl fortynnet DNA-konsentrat. Dette er for å sikre at hver prøve bruker minst 5 μl av DNA-konsentrat.
2. For hver prøve, beregn volumet (μl) av **DNA SD** som trengs for å fortynne 5 μl av DNA-konsentrat til 2 ng/μl:
$$\text{Volum av DNA SD som trengs i } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l av DNA-konsentrat} \times \text{konsentrasjon til DNA-konsentratet i ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Eksempel:

Konsentrasjon til DNA-konsentratet = 100 ng/μl

1. $\text{Volum av DNA SD som trengs i } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Bruk det beregnede volumet av **DNA SD** til å fortynne 5 μl av DNA-konsentrat.

Prøvefortynning

1. Klargjør riktig antall 1,5 ml mikrosentrifugerør med låsbart lokk for DNA-fortynninger ved å merke dem med riktig prøveidentifikasjon.
2. Bruk en pipette med aerosolbarrierespiss og pipetter det beregnede volumet av **DNA SD** i hvert merkede prøverør. Pipetter 45 μl **DNA SD** i et mikrosentrifugerør med låsbart lokk merket **NEG**.
3. Vortex hvert DNA-konsentrat og den negative kontrollen i 5 til 10 sekunder.
4. Bruk en pipette med aerosolbarrierespiss (ny spiss for hver pipettering) og pipetter forsiktig det beregnede volumet av hvert DNA-konsentrat i riktig rør med **DNA SD**. Pipetter 45 μl av negativ kontroll (ekstrahert eluat) i **NEG**-røret.
5. Kork rørene og vortex hvert rør i 5 til 10 sekunder.
6. Bytt hansker.

Klargjøring av reaksjoner

Tillaging av Working Master Mix (MMX-1, MMX-2 og MMX-3 v2)

Merk: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 og Working Master Mix er lysfølsomme og må beskyttes mot langvarig eksponering for lys.

Merk: Grunnet viskositeten til EGFR MMX-reagensene og Working Master Mix skal det pipetteres langsomt for å sikre at all blanding blir fullstendig dispensert fra spissen.

Merk: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 og EGFR MMX-3 v2 kan være lyseblå/lillaaktige. Dette påvirker ikke reagensenes ytelse.

Klargjør tre porsjoner med Working Master Mix, én som inneholder EGFR MMX-1, én som inneholder EGFR MMX-2 og én som inneholder EGFR MMX-3 v2 i separate 1,5 ml mikrosentrifugerør med låsbart lokk.

1. Beregn volumet av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 som trengs for hver Working Master Mix ved å bruke følgende formel:

$$\text{Volum av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 som trengs} = (\text{antall prøver} + 2 \text{ kontroller} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Beregn volumet av MGAC som trengs for hver Working Master Mix ved å bruke følgende formel:

$$\text{Volum av MGAC som trengs} = (\text{antall prøver} + 2 \text{ kontroller} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Bruk Tabell 4 for å bestemme volumer av hvert reagens som trengs for tillaging av Working Master Mix basert på antall prøver i analyseserien.

Tabell 4 Volumer av reagenser som trengs for Working MMX-1, Working MMX-2 og Working MMX-3 v2

		Antall prøver*									
		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
Totalvolum for hver Working Master Mix (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Volumer for antall prøver er basert på summen av antall prøver + 2 kontroller + 1

3. Ta ut riktig antall flasker med EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 og MGAC fra kjølelageret på 2 °C til 8 °C. Vortex hvert reagens i 5 sekunder for å samle væsken i bunnen av røret før bruk. Merk et sterilt mikrosentrifugerør for Working Master Mix-1, Working Master Mix-2 og Working Master Mix-3 v2.
4. Tilsett det beregnede volumet av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 til deres respektive rør med Working Master Mix.
5. Tilsett beregnet volum av MGAC til rørene med Working Master Mix.
6. Vortex rørene i 3 til 5 sekunder for å sikre tilstrekkelig blanding.

Merk: Prøver og kontroller skal tilsettes AD-platen innen 1 time etter tillaging av Working Master Mix.

Merk: Bruk kun AD-plate og forseglingsfilm for cobas® 4800-systemet.

Klargjøring av plate

1. Pipetter 25 µl Working Master Mix i hver reaksjonsbrønn på AD-platen som trengs for analyseserien. Ikke la pipettespissen berøre platen utenfor brønnen.
 - Tilsett Working Master Mix-1 (som inneholder **EGFR MMX-1**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 01, 04, 07 og 10, etter behov.
 - Tilsett Working Master Mix-2 (som inneholder **EGFR MMX-2**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 02, 05, 08 og 11, etter behov.
 - Tilsett Working Master Mix-3 v2 (som inneholder **EGFR MMX-3 v2**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 03, 06, 09 og 12, etter behov.
2. Pipetter 25 µl **EGFR MC** i brønnene **A01**, **A02** og **A03** på AD-platen. Bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.
3. Bruk en ny pipettespiss og pipetter 25 µl **NEG** i brønnene **B01**, **B02** og **B03** på AD-platen. Bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.

Merk: Hver analyseserie må inneholde **EGFR MC** i brønn **A01**, **A02** og **A03**, og **NEG** i brønn **B01**, **B02** og **B03**, ellers blir analyseserien gjort ugyldig av **cobas® z 480-analysatoren**.

Merk: Bytt hansker ved behov for å forebygge kontaminasjon fra prøve til prøve og kontaminasjon av utsiden av PCR-reaksjonsrøret.

4. Bruk nye pipettespisser for hvert fortynnet prøve-DNA og tilsett 25 µl av det første prøve-DNA-et til brønn **C01**, **C02** og **C03** på AD-platen. Bruk en ny pipettespiss for å tilsette prøve-DNA i hver brønn, og bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger. Gjenta denne prosedyren for DNA-et for hver prøve, og følg malen i Figur 2 til alle DNA-prøvefortynninger er tilsatt i AD-platen. Sørg for at all væske er samlet i bunnen av brønnene.
5. Dekk AD-platen med forseglingsfilm (leveres med platene). Bruk forseglingsfilmapplikatoren til å forsegle filmen godt til AD-platen.
6. Kontroller at all væske er samlet i bunnen av hver brønn før du starter PCR.

Merk: Amplifikasjon og deteksjon skal startes innen 1 time etter at den første prøve-DNA-fortynningen ble tilsatt i Working Master Mix.

Starte PCR

Se operatørmanualen for **cobas® 4800**-systemet eller brukerhjelpen for **cobas® 4800**-systemet for detaljerte instruksjoner om trinnene i EGFR-arbeidsflyten. Når vinduet "Select test" vises, velger du "EGFR Tissue P1" og klikker på knappen "OK".

Resultater

Tolkning av resultater

Merk: All analyseserie- og prøvevalidering utføres av **cobas® 4800**-programvaren.

Merk: En gyldig analyseserie kan omfatte både gyldige og ugyldige prøveresultater.

Prøveresultater fra en gyldig analyseserie tolkes som vist i Tabell 5.

Tabell 5 Tolkning av resultater for cobas EGFR-testen

Testresultat	Mutasjonsresultat	Tolkning
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Mer enn én mutasjon kan forekomme)	Mutasjon detektert i spesifisert EGFR-målregion.
No Mutation Detected (NMD)*	N/A	Mutasjon ikke detektert i spesifiserte EGFR-målregioner
Invalid	N/A	Prøveresultat er ugyldig. Gjenta testing av prøver med ugyldige resultater i samsvar med instruksjonene i avsnittet “Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater” .
Failed	N/A	Mislykket grunnet feil ved maskinvare eller programvare. Kontakt ditt lokale Roche-kontor for teknisk støtte.

* Et “No Mutation Detected”-resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon i EGFR-målregionene, fordi resultatene avhenger av prosentvise mutantsekvenser, tilstrekkelig god prøveintegritet, fravær av hemmere og tilstrekkelig med DNA til å kunne detekteres.

Du finner resultatflagg på fanen “Results” (skjerm bilde) eller i kolonnen “Flags” (rapport). Se avsnittet **Resultatflagg** for mer informasjon.

Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater

- Gjenta fortynning av det ugyldige prøve-DNA-konsentratet ved å starte med prosedyrene “Kalkulering av fortynning av prøve-DNA-konsentrat” og “Prøvefortynning” i avsnittet **Amplifikasjon og deteksjon**.
- Når DNA-konsentratet er fortynnet til 2 ng/μl som beskrevet i “Prøvefortynning”, kan du fortsette med “Tillaging av Working Master Mix (MMX-1, MMX-2 og MMX-3 v2)” og resten av prosedyren for amplifikasjon og deteksjon.

Merk: Hvis prøven fortsatt er ugyldig etter gjentatt testing, eller hvis det ikke var nok DNA-konsentrat til å klargjøre en annen fortynning i trinn 1 i **Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater**, skal hele testprosedyren for den aktuelle prøven gjentas. Start med deparafinering og DNA-isolering ved bruk av et nytt FFPET-tumorsnitt på 5 μm.

Kvalitetskontroll og gyldighet av resultater

Ett sett med **cobas** EGFR test mutantkontroll (**EGFR MC**) (brønn **A01**, **A02** og **A03**) og negativ kontroll (**NEG**) (brønn **B01**, **B02** og **B03**) for Working Master Mix-1, Working Master Mix-2 og Working Master Mix-3 v2 er inkludert i hver analyseserie for opptil 30 prøver. En analyseserie er gyldig hvis **EGFR MC** og **NEG** er gyldige. Hvis en **EGFR MC** eller **NEG** er ugyldig, blir hele analyseserien ugyldig og må gjentas. Klargjør en fersk fortynning av den tidligere isolerte prøve-DNA-konsentratet, for å sette opp en ny AD-platte med kontroller for amplifikasjon og deteksjon.

Mutantkontroll

Resultatet for **EGFR MC** må være “Valid” (Gyldig). Hvis **EGFR MC**-resultatene konsekvent er ugyldige, må du kontakte det lokale Roche-kontoret for teknisk assistanse.

Negativ kontroll

Resultatet for **NEG** må være “Valid” (Gyldig). Hvis **NEG**-resultatene konsekvent er ugyldige, må du kontakte det lokale Roche-kontoret for teknisk assistanse.

Testens begrensninger

1. Test kun de angitte prøvematerialene. **cobas** EGFR-testen er validert for bruk med NSCLC FFPET-tumorprøver.
2. **cobas** EGFR-testen er bare validert for bruk med **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Deteksjon av en mutasjon er avhengig av antallet kopier som er til stede i prøven, og kan påvirkes av prøvens integritet, mengden isolert DNA og tilstedeværelse av interfererende substanser.
4. Pålitelige resultater er avhengig av adekvat prøvefiksering, transport, oppbevaring og håndtering. Følg prosedyrene i bruksanvisningen for **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), i denne bruksanvisningen og i operatørmanualen for **cobas**® 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**® 4800-systemet.
5. Effekten av andre mulige variabler, som prøvefikseringsvariabler, er ikke evaluert.
6. Tilsetning av AmpErase-enzym i **cobas** EGFR-testens Master Mix muliggjør selektiv amplifikasjon av mål-DNA. Kontaminering av reagensene kan imidlertid bare unngås gjennom gode laboratorierutiner og ved å følge prosedyrene som er spesifisert i denne bruksanvisningen nøye.
7. Dette produktet må kun brukes av personell som har fått opplæring i PCR-teknikker og i bruken av **cobas**® 4800-systemet.
8. Dette produktet er kun validert for bruk med **cobas**® z 480-analysatoren. Ingen annen termocycler med optisk sanntidsdeteksjon kan brukes sammen med dette produktet.
9. På grunn av iboende forskjeller mellom teknologier anbefales det at brukerne utfører metodekorrelasjonsstudier i laboratoriet for å bestemme de teknologiske forskjellene før en ny teknologi tas i bruk.
10. Tilstedeværelsen av PCR-hemmere kan føre til falske negative eller ugyldige resultater.
11. Selv om det er sjelden, kan mutasjoner innenfor de genomiske DNA-regionene i EGFR-genet som **cobas** EGFR-testens primere og/eller prober er rettet mot, resultere i manglende evne til å detektere forekomst av en mutasjon i ekson 18, 19, 20 og 21 (resultat “No Mutation Detected”).
12. **cobas** EGFR-testen viser kryssreaktivitet (resultat “Mutation Detected”) for L747S-mutasjonen i ekson 19, en sjelden ervervet mutasjon som kan medføre resistens mot TKI-behandling.¹⁹
13. **cobas** EGFR-testen er validert for bruk med 50 ng DNA per reaksjonsbrønn. DNA-innmatingsmengder under 50 ng per reaksjonsbrønn anbefales ikke.

14. **cobas** EGFR-testen er en kvalitativ test. Testen er ikke beregnet for kvantitativ måling av prosentvis mutasjon.
15. NSCLC FFPET-prøver som inneholder forringet DNA, kan svekke testens evne til å detektere EGFR-mutasjonene.
16. Prøver med resultater som rapporteres som “No Mutation Detected”, kan inneholde EGFR-mutasjoner som ikke detekteres av analysen.
17. **cobas** EGFR-testen detekterer EGFR-mutasjoner hos NSCLC-pasienter med tumorer som har substitusjonsmutasjoner i ekson 18 (G719X), delesjonsmutasjoner i ekson 19, innskudds- og substitusjonsmutasjoner i ekson 20 (T790M, S768I) og substitusjonsmutasjoner i ekson 21 (L858R, L861Q), men ingen andre EGFR-mutasjoner.

Evaluering av analytisk ytelse

Merk: Studiebeskrivelsene nedenfor omfatter kumulative data som er samlet inn med v1 og v2 av **cobas** EGFR-testen.

For de ikke-kliniske studiene som beskrives nedenfor, ble prosentvis tumor vurdert med patologigranskning. Bidireksjonal Sanger-sekvensering og neste generasjon sekvensering (NGS) ble brukt til å velge prøvene som skulle testes. Prosentvis mutasjon i NSCLC FFPET-prøve ble bestemt ved bruk av en NGS-metode.

Analytisk sensitivitet – blankgrense

For å vurdere ytelsen til **cobas** EGFR-testen i fravær av templat og for å sikre at en blankprøve ikke genererer et analytisk signal som kan indikere en lav mutasjonskonsentrasjon, ble prøver uten templat og NSCLC FFPET EGFR-villtypeprøver evaluert. Ved bruk av analysen som er beskrevet i retningslinjen CLSI EP17-A2²⁰, ble blankgrensen bestemt til å være null for alle mutasjoner.

Deteksjonsgrense ved bruk av FFPET-prøveblandinger

Tre DNA-ekstrakter fra FFPET-prøver for delesjonsmutasjoner i ekson 19, fire DNA-ekstrakter fra FFPET-prøver for L858R-mutasjonen, to DNA-ekstrakter fra doble FFPET-mutantprøver for L858R- og T790M-mutasjoner, to DNA-ekstrakter fra FFPET-prøver for G719A-mutasjonen, ett DNA-ekstrakt fra dobbel FFPET-mutantprøve for T790M og G719A, ett DNA-ekstrakt fra dobbel FFPET-mutantprøve for G719C- og S768I-mutasjoner, ett DNA-ekstrakt fra dobbel FFPET-mutantprøve for S768I og G719S, tre DNA-ekstrakter fra FFPET-prøver for innskuddsmutasjon i ekson 20 og tre DNA-ekstrakter fra FFPET-prøver for L861Q-mutasjonen ble blandet med EGFR-villtype-FFPET-prøveekstrakter for å oppnå prøveblandinger med et målmutasjonsnivå på 10, 5,0, 2,5 og 1,25 %, som bestemt med neste generasjon sekvenseringsmetode (NGS), som var validert for bruk til å detektere EGFR-mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21. Serielle fortyndinger av hver prøveblanding ble tillaget, og åtte replikater av hver panelprøve ble analysert ved bruk av tre **cobas** EGFR-testkitloter (n = 24 / panelprøve). Deteksjonsgrensen for hver prøve ble bestemt med den laveste DNA-mengden som ga en EGFR “Mutation Detected”-rate på minst 95 % for målmutasjonen, som vist i Tabell 6.

Tabell 6 Deteksjonsgrense for cobas EGFR-testen ved bruk av FFET-prøveblandinger

EGFR-ekson	EGFR-mutasjons-gruppe	EGFR-nukleinsyresekvens	Prosentvis mutasjon i panelprøven for å oppnå en ≥ 95 % “Mutation Detected”-rate med 50 ng DNA-innmating per reaksjonsbrønn (N = 24 replikater)	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	Ekson 19-delesjon	2235_2249del15	1,4	6223
		2236_2250del15	2,5	6225
		2239_2256del18*	4,7	6255
		2240_2254del15	7,2	12369
		2240_2257del18	13,4**	12370
		2239_2248>C	2,2	12382
		2237_2255>T*	4,1	12384
		2237_2253>TTGCT*	6,3	12416
		2238_2252del15	2,4	23571
		2238_2252del15*	5,5	23571
2239_2257>GT*	6,0	Ikke funnet		
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
	Ekson 20-innskudd	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

* Kun et enkelt målmutasjonsnivå på ca. 5 % ble testet for disse ikke-dominerende delesjonsmutasjonene i ekson 19 som fantes i EURLAC-kohorten. DNA fra prøveblandinger ble testet på 3 studiesteder.

** Deteksjonsgrense for **cobas** EGFR-testen for denne mutasjonen er større enn 10 % mutasjonsnivå ved bruk av standardinnmating på 50 ng per reaksjonsbrønn.

Denne studien viser at **cobas** EGFR-testen kan detektere mutasjoner i EGFR-ekson 18, 19, 20 og 21 med et mutasjonsnivå på minst 5 % ved bruk av standardinnmating på 50 ng per reaksjonsbrønn.

Minimum tumorinnhold

Til sammen 66 uavhengige EGFR-mutantprøver (dvs. 35 delesjonsmutanter i ekson 19, og 31 L858R-mutanter i ekson 21) med tumorinnhold fra 25 % til 99 % ble testet for å bestemme det minste tumorinnholdet som var påkrevd for å detektere EGFR-mutasjon i NSCLC-prøver. Ingen av de evaluerte prøvene hadde både en delesjonsmutasjon i ekson 19 og en L858R-mutasjon i ekson 21. Hver prøve ble testet uten makrodisseksjon (ufortynnet), og etter makrodisseksjon. De observerte CtR-verdiene for ufortynnede objektglassprøver ble analysert med Deming-regresjon og Bland-Altman-plott (differanser vs. middelerdi). Resultatene underbygger bruk av prøver med et tumorinnhold som er større enn 25 %, uten makrodisseksjon.

Ytterligere 10 EGFR NSCLC-villtypeprøver (1–90 % tumorinnhold) og 10 EGFR-mutantprøver (8–95 % tumorinnhold) ble testet for å bestemme hvorvidt makrodisseksjon av NSCLC-tumorvev med lav prosentandel av tumor ville forbedre deteksjonsevnen til **cobas** EGFR-testen. Hver prøve ble testet uten makrodisseksjon (ufortynnet), og etter makrodisseksjon. Alle makrodissekerte resultater samsvarte med ikke-makrodissekerte resultater, og de forventede mutasjons- og villtyperesultater ble observert for alle 20 prøver.

I fase III av EORTC-studien som sammenlignet erlotinibbasert og cisplatinbasert kjemoterapi, ble NSCLC FFPET-prøver med mindre enn 10 % tumorinnhold makrodissekert før EGFR mutasjonsanalyse. En undergruppe av de EORTC-screenede prøvene ble evaluert for EGFR-mutasjonsstatus med både **cobas** EGFR-testen og neste generasjon sekvenseringsmetoder (NGS). Tabell 7 og Tabell 8 inkluderer NSCLC-prøver med gyldige parede resultater for både EGFR ekson 19- og L858R-mutasjoner fra **cobas** EGFR-testen og NGS-sekvenseringen. Ved bruk av NGS som referansem metode viste resultatene at makrodisseksjon av NSCLC FFPET-snitt med mindre enn 10 % tumorinnhold ga en analytisk nøyaktighet som var sammenlignbar med NSCLC FFPET-snitt uten makrodisseksjon.

Samlet underbygger disse studiene at makrodisseksjon er påkrevd for NSCLC FFPET-snitt med mindre enn 10 % tumorinnhold for testing med **cobas** EGFR-testen.

Tabell 7 Ytelsen til cobas EGFR-testen for NSCLC FFPET-prøver med tumorinnhold ≤ 10 % (makrodissekert)

Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Positivt prosentvis samsvar (PPA)	97,2 % (35/36)	85,8 %, 99,5 %
Negativt prosentvis samsvar (NPA)	94,5 % (52/55)	85,1 %, 98,1 %
Samlet prosentvis samsvar (OPA)	95,6 % (87/91)	89,2 %, 98,3 %

Tabell 8 Ytelsen til cobas EGFR-testen for NSCLC FFPET-prøver med tumorinnhold > 10 % (ikke-makrodissekert)

Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Positivt prosentvis samsvar (PPA)	93,0 % (107/115)	86,9 %, 96,4 %
Negativt prosentvis samsvar (NPA)	98,5 % (199/202)	95,7 %, 99,5 %
Samlet prosentvis samsvar (OPA)	96,5 % (306/317)	93,9 %, 98,1 %

Kryssreaktivitet til andre mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21

Prøver fra den kliniske EURTAC-studien

cobas EGFR-testen ga resultatet “Mutation Detected” for følgende EGFR-mutasjoner observert i prøvene fra den kliniske EURTAC-studien (Tabell 9). Den analytiske ytelsen til cobas EGFR-testen ved deteksjon av disse mutasjonene er ikke blitt evaluert.

Tabell 9 Mutasjoner observert i EURTAC-kohorten som ble påvist å kryssreagere med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Ikke funnet
	2236_2244del9	E746_R748>E	Ikke funnet
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Ikke funnet
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Ikke funnet

Prøver fra den kliniske AURA2-studien

cobas EGFR-testen ga resultatet “Mutation Detected” for følgende EGFR-mutasjon observert i prøvene fra den kliniske AURA2-studien (Tabell 10). Den analytiske ytelsen til cobas EGFR-testen ved deteksjon av denne mutasjonen er ikke blitt evaluert.

Tabell 10 Mutasjoner observert i AURA2-studien som ble påvist å kryssreagere med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	COSMIC ID ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Spesifisitet – mikroorganismer og EGFR-homologer

Spesifisiteten til cobas EGFR-testen ble evaluert ved å teste lungerelaterte mikroorganismer og plasmider av EGFR-homologer, dvs. plasmider som inneholder sekvensene fra hver av de genetiske HER2-, HER3- og HER4-regionene som er analoge med sekvensene i EGFR-ekson 18, 19, 20 og 21 amplifisert med cobas EGFR-testen.

Lungerelaterte mikroorganismer

Streptococcus pneumoniae og *Haemophilus influenzae* i 4×10^5 CFU (kolonidannende enheter) ble funnet ikke å kryssreagere eller interferere med cobas EGFR-testen da de ble tilsatt i prøver som inneholdt villtype- og mutant-EGFR-sekvenser under lyseringstrinnet.

Plasmider av EGFR-homologer

Strukturelt relatert epidermal reseptor tyrosinkinaseprotein (EGFR/HER1, HER2, HER3 og HER4) viste seg ikke å kryssreagere med cobas EGFR-testen da den potensielt kryssreaktive sekvensen ble tilsatt med et antall genomiske kopier som tilsvarte 50 ng/PCR-innmating til DNA-konsentratet før amplifikasjons-/deteksjonsprosedyren. En kontrollbetingelse uten plasmid-DNA ble inkludert. Resultatene indikerte at de observerte mutasjonene for alle de 15 testede FFPET-prøvene samsvarte med den forventede mutasjonen som bestemt ved sekvensering, ved nærvær og fravær av det tilsatte HER-genets plasmid-DNA. I tillegg ble EGFR ekson 19-mutasjonen L747S testet for kryssreaktivitet. Resultatene indikerte at cobas EGFR-testen kryssreagerer med EGFR ekson 19-mutasjonen L747S.

Interferens

Triglyserider (37 mM, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹) og hemoglobin (2 mg/ml, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹) viste seg ikke å interferere med **cobas** EGFR-testen da den potensielt interfererende substansen ble tilsatt i lyseringstrinnet under prøveprepareringsprosedyren.

Albuterol (Ventoline), ipratropium (Atrovent), flutikason (Flonase), ceftazidime (Fortaz), imipenem/cilastin (Primaxin), piperacillin/tazobaktam, cilastin (Cilastatin natrium), betadine og lidokain viste seg ikke å interferere med ytelsen til **cobas** EGFR-testen da de ble tilsatt i lyseringstrinnet under prøveprepareringsprosedyren.

Nekrotisk vev

NSCLC FFPET-prøver med et nekrotisk vevsinnhold på opptil 60 % for EGFR-mutantprøver og 85 % for villtypeprøver viste seg ikke å interferere med mutasjonstyperesultatene ved bruk av **cobas** EGFR-testen.

Repeterbarhet

Repeterbarheten til **cobas** EGFR-testen ble vurdert ved bruk av seks FFPET-prøver: to EGFR-villtypeprøver og fire EGFR-mutantprøver med henholdsvis én ekson 19-delesjonsmutasjon, én S768I- og G719X-mutasjon, én T790M- og L858R-mutasjon og én ekson 20-innskuddsmutasjon. Disse prøvene ble testet i duplikat av to operatører ved bruk av to ulike reagenslot og to **cobas**® z 480-analysatorer over fire dager. Til sammen 32 replikater ble evaluert per prøve. **cobas** EGFR-testen hadde en korrekt mutasjonstyperate på 96,9 % (186/192).

Repeterbarheten til **cobas** EGFR-testen ble også vurdert i en annen studie ved bruk av fire FFPET-prøver: én EGFR-villtypeprøve og tre EGFR FFPET-mutantprøver med henholdsvis én L861Q-mutasjon, én G719X-mutasjon og én ekson 20-innskuddsmutasjon. Prøvene ble testet i duplikat av to operatører ved bruk av to ulike reagenslot og to **cobas**® z 480-analysatorer over flere dager. **cobas** EGFR-testen hadde en korrekt mutasjonstyperate på 99,2 % (127/128) for alle prøvereplikater, operatører, reagenslot og instrumenter.

Prøvehåndtering og reproduserbarhet

Reproduserbarheten til **cobas**® DNA Sample Preparation Kit ble undersøkt ved å bruke snitt tatt fra tre FFPET-prøveblokker: én som inneholdt en delesjonsmutasjon i ekson 19, én som inneholdt en L858R-mutasjon, og én som var en villtype. Hver prøve ble testet i duplikat på hvert sted hver dag. Prøvesnittene for en gitt prøve ble randomisert og testet i løpet av en periode på seks dager på tre steder, med én operatør på hvert sted, én **cobas**® z 480-analysator på hvert sted, tre kitloter for **cobas**® DNA Sample Preparation Kit og én **cobas** EGFR-testkitlot. På hver testdag isolerte og testet hver operatør DNA fra to NSCLC FFPET-curl-snitt for hver prøve ved bruk av **cobas** EGFR-testen. Alle prøver rapporterte gyldige og korrekte resultater i løpet av de seks testdagene. For alle prøver og operatører hadde **cobas** EGFR-testen en korrekt mutasjonstyperate på 100 % (108/108).

Evaluering av klinisk ytelse

Klinisk reproducerbarhetsstudie 1

Det ble utført en ekstern studie for å vurdere reproducerbarheten til **cobas** EGFR-testen over 3 eksterne teststeder (2 operatører per sted), ved bruk av 3 reagensloter og over 5 ikke-etterfølgende testdager, med et panel bestående av 13 DNA-prøver ekstrahert fra FFPET-snitt av tumorprøver med NSCLC villtype (WT) og mutanttype (MT). Dette panelet inkluderte L858R-mutasjonen i ekson 21 og fem ulike ekson 19-delesjonsmutasjoner. Av 92 analyseserier var 90 (97,8 %) gyldige. Til sammen 2340 tester ble utført på de 13 panelprøvene i 90 gyldige analyseserier. Alle testresultatene var gyldige. Det var ingen "Mutation Detected"-resultater i 180 gyldige tester av villtypepanelprøvene, noe som ga 100 % samsvar. Samsvarene var 100 % for 10 av de 12 mutasjonspanelprøvene. For panelprøve EX19_2240_2257del18 – 5 % mutasjon, var samsvaret 62,8 % (67 av 180 testresultater var "No Mutation Detected"). For panelprøve EX19_2240_2257del18 – 10 % mutasjon, var samsvaret 99,4 % (1 av 180 testresultater var "No Mutation Detected"). Resultatene vises etter samlet samsvar i Tabell 11. Variasjonskoeffisienten (CV) var < 6 % i alle mutasjonspanelprøvene. I hver panelprøve var variasjonskoeffisienten (CV) < 3,5 %. For ekstern kontroll var samlet variasjonskoeffisient (CV) < 1,3 %. Den prosentvise variasjonskoeffisienten (CV) var < 0,5 % mellom loter og < 1,2 % innen lot.

Tabell 11 Estimert samlet samsvar etter panelprøve i reproducerbarhetsstudie 1 med cobas EGFR-testen

Panelprøve	Antall gyldige tester	Samsvar (N)	Samsvar % (95 % KI) ^a
Villtype	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – 5 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – ≤ 10 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – 5 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – ≤ 10 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – 5 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – ≤ 10 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – 5 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – ≤ 10 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 – 5 % mutasjon	180	113	62,8 (55,3, 69,9)*
EX19_2240_2257del18 – ≤ 10 % mutasjon	180	179	99,4 (96,9, 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R – 5 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R – ≤ 10 % mutasjon	180	180	100 (98,0, 100,0)

Merk: Resultater var i samsvar når en mutanttypepanelprøve (MT) hadde et gyldig "Mutation Detected"-resultat eller når en villtypepanelprøve hadde et gyldig "No Mutation Detected"-resultat.

^a 95 % KI = 95 % eksakt binomialt konfidensintervall.

* Analytisk sensitivitet for **cobas** EGFR-testen for deteksjon av denne mutasjonen er større enn 10 % mutasjonsnivå ved bruk av standardinnmating på 50 ng per reaksjonsbrønn.

Klinisk reproduserbarhetsstudie 2

Det ble utført en ekstern studie for å vurdere reproduserbarheten til **cobas** EGFR-testen over 3 teststeder (2 eksterne og 1 internt, 2 operatører per sted), ved bruk av 3 reagensloter og over 5 ikke-etterfølgende testdager, med et panel bestående av 11 DNA-prøver ekstrahert fra FFPE-snitt av tumorprøver med NSCLC villtype (WT) og mutanttype. Dette panelet inkluderte G719X-mutasjonen i ekson 18, T790M-mutasjonen i ekson 20, S768I-mutasjonen i ekson 20, innskuddsmutasjon i ekson 20 og L861Q-mutasjonen i ekson 21. Av 91 analyseserier var 90 (98,9 %) gyldige. Til sammen 1980 tester ble utført på 11 panelprøver testet i duplikat i 90 gyldige analyseserier. Alle testresultatene var gyldige. Det var ingen "Mutation Detected"-resultater i 180 gyldige tester av villtypepanelprøvene, noe som ga 100 % samsvar. Det var 100 % samsvar for alle mutantpanelprøvene, bortsett fra for LoD-panelprøven med innskuddsmutasjon i ekson 20. Resultatene vises etter samlet samsvar i Tabell 12 nedenfor. Variasjonskoeffisienten (CV) var < 9,2 % i alle mutantpanelprøvene. For ekstern kontroll var samlet variasjonskoeffisient (CV) ≤ 1,3 %. Variasjonskoeffisienten (CV) var ≤ 0,6 % mellom loter og ≤ 1,1 % innen lot.

Tabell 12 Estimert samlet samsvar etter panelprøve i reproduserbarhetsstudie 2 med cobas EGFR-testen

Panelprøve	Antall gyldige tester	Samsvar (N)	Samsvar % (95 % KI)*
Villtype	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 18 G719X – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 T790M – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 S768I – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 innskudd – LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
Ekson 21 L861Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 18 G719X – 2×LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 T790M – 2×LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 S768I – 2×LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 20 innskudd – 2×LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekson 21 L861Q – 2×LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Merk: Resultatene var i samsvar når en mutanttypepanelprøve hadde et gyldig "Mutation Detected"-resultat for målmutasjonen, eller når en villtypepanelprøve hadde et gyldig NMD-resultat.

* 95 % KI = 95 % eksakt binomialt konfidensintervall.

KI = konfidensintervall; LoD = deteksjonsgrense; NMD = ingen mutasjon detektert

Korrelasjon til referansem metode ved bruk av Fase III-prøver fra EURTAC-studien

Den kliniske ytelsen til **cobas** EGFR-testen ble vurdert ved å sammenligne den med to referansemetoder – 2× bidireksjonal Sanger-sekvensering og kvantitativ nestegenerasjons sekvensering (NGS) – ved bruk av 487 formalinfikserte, parafininnstøpte lungetumoprøver fra pasienter med fremskreden NSCLC som ble screenet i fase III i EURTAC-studien, som sammenlignet TARCEVA® (erlotinib) og cisplatinbasert kjemoterapi.^{6,22} De kliniske og demografiske karakteristika for pasienter med prøver som var tilgjengelige for denne retrospektive testingen, ble sammenlignet med karakteristika for pasienter som ellers var kvalifisert (557), men hvis prøver ikke var tilgjengelige for gjentatt testing.

Til sammen 1276 pasienter ble screenet for EURTAC-studien ved bruk av en kombinasjon av laboratorieutviklede tester, samlet omtalt som den kliniske studieanalysen (CTA). Etter at ikke-kvalifiserte pasienter og pasienter uten CTA-resultater var ekskludert, var 1044 pasienter potensielt kvalifisert for denne studien. Blant de 1044 kvalifiserte pasientene hadde 225 pasienter prøver som var mutasjonspositive med CTA, 792 hadde prøver som var villtype (WT) med CTA, og 27 hadde prøver med ikke-konklusive resultater med CTA. Av de 1044 potensielt kvalifiserte pasientene var 487 prøver tilgjengelige for gjentatt testing med **cobas** EGFR-testen.

Alle de 487 prøvene ble blindtestet med både **cobas** EGFR-testen og Sanger-sekvensering. Av disse hadde 406 gyldige resultater med både **cobas** EGFR-testen og Sanger-sekvensering, 38 ugyldige resultater ble observert med **cobas** EGFR-testen og Sanger-sekvensering, 38 ugyldige resultater med bare Sanger-sekvensering og 5 ugyldige resultater med bare **cobas** EGFR-testen. Blant de 487 prøvene som var tilgjengelige for gjentatt testing med **cobas** EGFR-testen, ga 444 prøver gyldige resultater med **cobas** EGFR-testen og ble også testet med NGS. Av disse var det 36 ugyldige resultater med NGS. Det var derfor 408 prøver som hadde gyldige resultater med både **cobas** EGFR-testen og NGS. Den analytiske nøyaktigheten til **cobas** EGFR-testen sammenlignet med hver referansem metode ble evaluert ved å anslå det positive prosentvise samsvaret (PPA), det negative prosentvise samsvaret (NPA) og det samlede prosentvise samsvaret (OPA) og deres tilsvarende 95 %-konfidensintervaller for ekson 19-delesjoner og L858R-mutasjoner samlet, og hver for seg.

I EURTAC-kohorten detekterte **cobas** EGFR-testen mutasjoner i ekson 19 og ekson 21 i EGFR-genet, som angitt i Tabell 13. Av mutasjonene som ble detektert i EURTAC-kohorten, ble analytisk sensitivitet demonstrert for mutasjonene som er oppført i Tabell 6.

Tabell 13 Mutasjoner detektert i EURTAC-kohorten med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	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	Ikke funnet
	2236_2244del9	E746_R748>E	Ikke funnet
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Ikke funnet
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Ikke funnet
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Ikke funnet
21	2573 T>G	L858R	6224

Til sammen 406 prøver med gyldige resultater med **cobas** EGFR-testen og Sanger-sekvensering ble inkludert i samsvarsanalysen. Det positive prosentvis samsvaret (PPA) mellom **cobas** EGFR-testen og Sanger-sekvensering var 96,6 % (95 % KI: 91,5 % til 98,7 %), og det negative prosentvis samsvaret (NPA) var 88,3 % (95 % KI: 84,1 % til 91,5 %) ved deteksjon av ekson 19-delesjoner og L858R-mutasjoner samlet, som vist i Tabell 14. Samlet prosentvis samsvar (OPA) var 90,6 %, med den nedre grensen for 95 % KI over 87 %. Positivt prosentvis samsvar (PPA), negativt prosentvis samsvar (NPA) og samlet prosentvis samsvar (OPA) ved deteksjon av ekson 19-delesjonsmutasjoner var alle > 92 %. Positivt prosentvis samsvar (PPA), negativt prosentvis samsvar (NPA) og samlet prosentvis samsvar (OPA) ved deteksjon av L858R-mutasjoner var alle > 95 %.

Tabell 14 Sammenligning av cobas EGFR-testen med Sanger-sekvensering for deteksjon av EGFR ekson 19-delesjonsmutasjoner og L858R-mutasjon

Mutasjon	Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Ekson 19-delesjon	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	97,3 % (71/73)	90,5 %, 99,2 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	92,5 % (308/333)	89,2 %, 94,9 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	93,3 % (379/406)	90,5 %, 95,4 %
L858R	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	95,3 % (41/43)	84,5 %, 98,7 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	97,5 % (354/363)	95,4 %, 98,7 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	97,3 % (395/406)	95,2 %, 98,5 %
Samlet	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	96,6 % (112/116)	91,5 %, 98,7 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	88,3 % (256/290)	84,1 %, 91,5 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	90,6 % (368/406)	87,4 %, 93,1 %

Til sammen 408 prøver med gyldige resultater med **cobas** EGFR-testen og NGS ble inkludert i samsvarsanalysen. Sammenlignet var positivt prosentvis samsvar (PPA) og negativt prosentvis samsvar (NPA) mellom **cobas** EGFR-testen og NGS for deteksjon av ekson 19-delesjoner og L858R-punktsmutasjon samlet 94,0 % (95 % KI: 89,1 % til 96,8 %) og 97,7 % (95 % KI: 95,0 % til 98,9 %), som vist i Table 15. Samlet prosentvis samsvar (OPA) var 96,3 %, med en nedre grense for 95 % KI på 94,0 %. Positivt prosentvis samsvar (PPA), negativt prosentvis samsvar (NPA) og samlet prosentvis samsvar (OPA) ved deteksjon av ekson 19-delesjonsmutasjoner var alle > 95 %, med en nedre grense for alle 95 % KI på > 90 %. Positivt prosentvis samsvar (PPA), negativt prosentvis samsvar (NPA) og samlet prosentvis samsvar (OPA) ved deteksjon av L858R-mutasjonen var også alle > 95 %, med en nedre grense for alle 95 % KI på ≥ 95 %, unntatt for positivt prosentvis samsvar (PPA) (90 %), grunnet det lave antallet L858R-mutasjoner som ble detektert.

Table 15 Comparison of the cobas EGFR Test with NGS for the detection of EGFR exon 19 deletion mutations and L858R mutation

Mutasjon	Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Ekson 19-delesjon	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	95,9 % (94/98)	90,0 %, 98,4 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	99,7 % (309/310)	98,2 %, 99,9 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	98,8 % (403/408)	97,2 %, 99,5 %
L858R	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	90,6 % (48/53)	79,7 %, 95,9 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	98,6 % (350/355)	96,7 %, 99,4 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	97,5 % (398/408)	95,5 %, 98,7 %
Samlet	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	94,0 % (142/151)	89,1 %, 96,8 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	97,7 % (251/257)	95,0 %, 98,9 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	96,3 % (393/408)	94,0 %, 97,8 %

Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase II-prøver fra AURA2

Den kliniske ytelsen til **cobas** EGFR-testen ble vurdert ved å sammenligne den med en validert neste generasjon sekvenseringsplattform (NGS) ved bruk av 383 formalinfikserte, parafininnstøpte lungetumorprøver fra pasienter med fremskreden NSCLC som ble screenet ved bruk av **cobas** EGFR-testen i fase II i AURA2-studien av TAGRISSO® (osimertinib).

Til sammen 472 pasienter ble screenet for AURA2-studien ved bruk av **cobas** EGFR-testen. Etter at ikke-kvalifiserte pasienter var ekskludert, var 383 pasienter kvalifisert for denne studien.

Alle de 383 prøvene ble blindtestet med både **cobas** EGFR-testen og en validert NGS-metode. Av disse hadde 368 prøver gyldige resultater med både **cobas** EGFR-testen og NGS. Til sammen 2 ugyldige resultater ble observert med både **cobas** EGFR-testen og NGS, 2 ugyldige resultater med bare NGS, og 11 ugyldige resultater med bare **cobas** EGFR-testen. Den analytiske nøyaktigheten til **cobas** EGFR-testen sammenlignet med referansem metoden, NGS, for deteksjon av T790M-mutasjonen ble evaluert ved å anslå det positive prosentvise samsvaret (PPA), det negative prosentvise samsvaret (NPA) og det samlede prosentvise samsvaret (OPA) og deres tilsvarende 95 %-konfidensintervaller for T790M-mutasjonen.

I AURA2-studien detekterte **cobas** EGFR-testen mutasjoner i EGFR-genet, som angitt i Tabell 16. Av mutasjonene som ble detektert i AURA2-studien, ble analytisk sensitivitet demonstrert for mutasjonene som er oppført i Tabell 6.

Tabell 16 Mutasjoner detektert i AURA2-kohorten med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	COSMIC ID ¹⁴
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2235_2249delI15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250delI15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256delI18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2254delI15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257delI18	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_2251delI15	E746_T751>A	12678
	2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	13550
	2235_2252>AAT	E746_T751>I	13551
	2253_2276delI24	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

Til sammen 368 prøver med gyldige resultater med **cobas** EGFR-testen og NGS ble inkludert i samsvarsanalysen. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) mellom **cobas** EGFR-testen og NGS var 88,3 % (95 % KI: 83,8 % til 91,7 %), det negative prosentvise samsvaret (NPA) var 97,3 % (95 % KI: 92,4 % til 99,1 %), og det samlede prosentvise samsvaret (OPA) var 91,0 % (95 % KI: 87,7 % til 93,5 %) for deteksjon av T790M-mutasjonen, som vist i Tabell 17. Tretti prøver var positive med NGS, men negative med **cobas** EGFR-testen: i 10/30 prøver var den prosentvise T790M-mutasjonen bestemt med NGS under LoD (< 2 % mutasjon) for **cobas** EGFR-testen. I 20/30 prøver indikerte en moderat forsinket IC Ct-verdi dårlig amplifiserbarhet av DNA-templatet.

Tabell 17 Sammenligning av cobas EGFR-testen med NGS for deteksjon av EGFR T790M-mutasjonen

Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Positivt prosentvis samsvar (PPA)	88,3 % (226/256)	83,8 %, 91,7 %
Negativt prosentvis samsvar (NPA)	97,3 % (109/112)	92,4 %, 99,1 %
Samlet prosentvis samsvar (OPA)	91,0 % (335/368)	87,7 %, 93,5 %

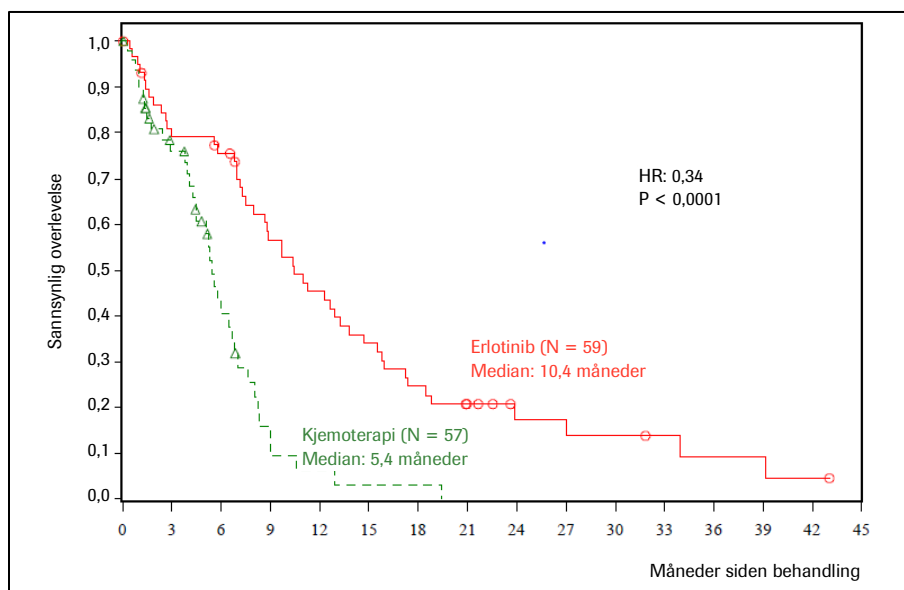
Kliniske resultater

EURTAC

EURTAC-studien²² var en åpen, randomisert multisenterstudie i fase III som sammenlignet TARCEVA® (erlotinib) med standard platinum-dublett kjemoterapi som førstelinjebehandling hos kjemoterapi-naive pasienter med fremskreden NSCLC med tumorer med EGFR-ekson 19-delesjoner eller ekson 21-substitusjonsmutasjoner (L858R), vurdert med en klinisk studieanalyse (CTA). Studien ble sponset av Spanish Lung Cancer Group (SLCG). Til sammen 174 pasienter var innrullert i studien. Studieresultatene viste en statistisk signifikant økning i progresjonsfri overlevelse (PFS) hos pasienter som fikk TARCEVA® (median PFS 10,4 måneder vs. 5,1 måneder) sammenlignet med pasienter som fikk kjemoterapi, med en hazard ratio på 0,34 ($p < 0,0001$, 95 % KI [0,23; 0,49]). Responsraten hos pasientene i gruppen som fikk TARCEVA®, var høyere enn responsraten hos pasientene som fikk kjemoterapi (65,1 % vs. 16,1 %). Det ble ikke observert noen signifikant forskjell i samlet overlevelse (OS) i de to gruppene, siden 76 % av pasientene i gruppen som fikk standard kjemoterapi, gikk over til å få TARCEVA®.

Av de 174 pasientene som var innrullert i EURTAC-studien, var 134 (77 % av studiepopulasjonen, inkludert 69 pasienter fra gruppen som fikk TARCEVA®, og 65 pasienter fra gruppen som fikk kjemoterapi) tilgjengelige for gjentatt testing og ble testet retrospektivt med **cobas** EGFR-testen. Av de 134 tilfellene som ble testet på nytt med **cobas** EGFR-testen, fikk 116 tilfeller (59 pasienter fra gruppen som fikk TARCEVA®, og 57 pasienter fra gruppen som fikk kjemoterapi) resultatet "Mutation Detected" med **cobas** EGFR-testen. Analyse av undergruppen med de 116 tilfellene viste at det var en signifikant økning av progresjonsfri overlevelse (PFS) blant pasientene som var behandlet med TARCEVA® (median PFS 10,4 vs. 5,4 måneder), og mindre sannsynlighet for en hendelse med progredierende sykdom eller død (HR = 0,34, 95 % KI [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) enn blant pasientene som var behandlet med kjemoterapi (Figur 3). Responsraten i TARCEVA®-gruppen var større enn i kjemoterapigruppen (59,3 % vs. 14,0 %). Det ble ikke observert noen signifikant forskjell i samlet overlevelse (OS) i de to gruppene. Den observerte kliniske nytten i undergruppen av pasienter som ble testet med **cobas** EGFR-testen, ble sammenlignet med den kliniske nytten som ble observert i hele studiepopulasjonen (Tabell 18).

Det ble utført ytterligere effektanalyser for å vurdere pasienter som testet positivt med **cobas** EGFR-testen, men som testet negativt eller ugyldig med CTA. I "worst case"-scenariet (med en anslått hazard ratio på 1 for pasienter som testet positivt med **cobas** EGFR-testen og negativt med CTA), viste dataene en hazard ratio på 0,42 (95 % KI [0,26; 0,57]).

Figur 3 Kaplan-Meier-plott for progresjonsfri overlevelse (PFS) per behandling for pasienter som fikk resultatet "Mutation Detected" med cobas EGFR-testen (utprøvers vurdering)**Tabell 18** Den kliniske nytten for pasienter testet med cobas EGFR-testen kan sammenlignes med den som ble observert i EURTAC-populasjonen

Parameter	Positiv populasjon med cobas EGFR-testen n = 116		EURTAC n = 173*	
	Kjemoterapi n = 57	Erlotinib n = 59	Kjemoterapi n = 87	Erlotinib n = 86
Progresjonsfri overlevelse (PFS)				
Median (Måneder)	5,4	10,4	5,1	10,4
Hazard ratio	0,34		0,34	
Hazard Ratio 95 % KI	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
P-verdi (log-rank-test)	< 0,0001		< 0,0001	

* Én pasient trakk tilbake sitt samtykke etter å ha fullført EURTAC-studien, noe som resulterte i et datasett på n = 173.

AURA2

AURA2-studien²³ var en fase II, multisenter, åpen enkeltarmstudie som undersøkte sikkerheten og effekten av TAGRISSO® (osimertinib) som en andre- eller ≥ tredjelinjeterapi hos pasienter med fremskreden NSCLC, som hadde progrediert etter terapi med et godkjent EGFR TKI-middel. Alle pasienter var nødt til å ha T790M-mutasjonspositiv NSCLC detektert med cobas EGFR-testen. Det primære effektmålet var objektiv responsrate (ORR) i henhold til RECIST 1.1, evaluert ved blindet uavhengig sentral vurdering (BICR) ved bruk av analysesettet for responsevaluering. ORR var definert som antall (%) pasienter med minst 1 besøk og et resultat av komplett respons (CR) eller delvis respons (PR) som ble bekreftet minst 4 uker senere (dvs. den beste objektive responsen [BOR] av CR eller PR).

Av de 472 pasientene som ble screenet for AURA2-studien, var 383 pasienter kvalifisert for testing med cobas EGFR-testen. Av disse kvalifiserte ble 233 T790M-positive pasienter rekruttert til AURA2-studien, og 210 pasienter ble inkludert og fikk TAGRISSO® (komplett analysesett [FAS]).

Tabell 19 nedenfor viser ORR ved BICR og utprøvers vurdering i AURA2. Av 210 pasienter som fikk minst én dose med TAGRISSO® (FAS), var 128 bekreftede respondenter ved BICR med en ORR på 61,0 % (95 % KI: 54,0 % til 67,6 %), og 135 ved utprøvers vurdering med en ORR på 64,3 % (95 % KI: 57,4 % til 70,8 %).

Alle 383 pasienter som var kvalifisert for AURA2-studien, ble testet på nytt med **cobas** EGFR-test. Av 233 T790M-positive pasienter som ble rekruttert til AURA2-studien, var 225 T790M-positive med **cobas** EGFR-test, og 204 var i FAS.

Av 204 pasienter som fikk TAGRISSO® (FAS), var 127 bekreftede respondenter ved BICR med en ORR på 62,3 % (95 % KI: 55,2 % til 68,9 %), og 133 ved utprøvers vurdering med en ORR på 65,2 % (95 % KI: 58,2 % til 71,7 %).

Tabell 19 Den kliniske nytten for T790M-positive pasienter testet med cobas EGFR-testen i AURA2-studien

		AURA2			cobas EGFR-test (IVD) T790M-positiv		
Analysesett	Vurdert ved	N	Antall bekreftede respondenter	ORR (95 % KI)	N	Antall bekreftede respondenter	ORR (95 % KI)
Komplett analysesett (FAS)	Blindet uavhengig sentral vurdering	210	128	61,0 % (54,0 %, 67,6 %)	204	127	62,3 % (55,2 %, 68,9 %)
	Utpøver		135	64,3 % (57,4 %, 70,8 %)		133	65,2 % (58,2 %, 71,7 %)

FLAURA

I. Fase III-studie for TAGRISSO® førstelinje

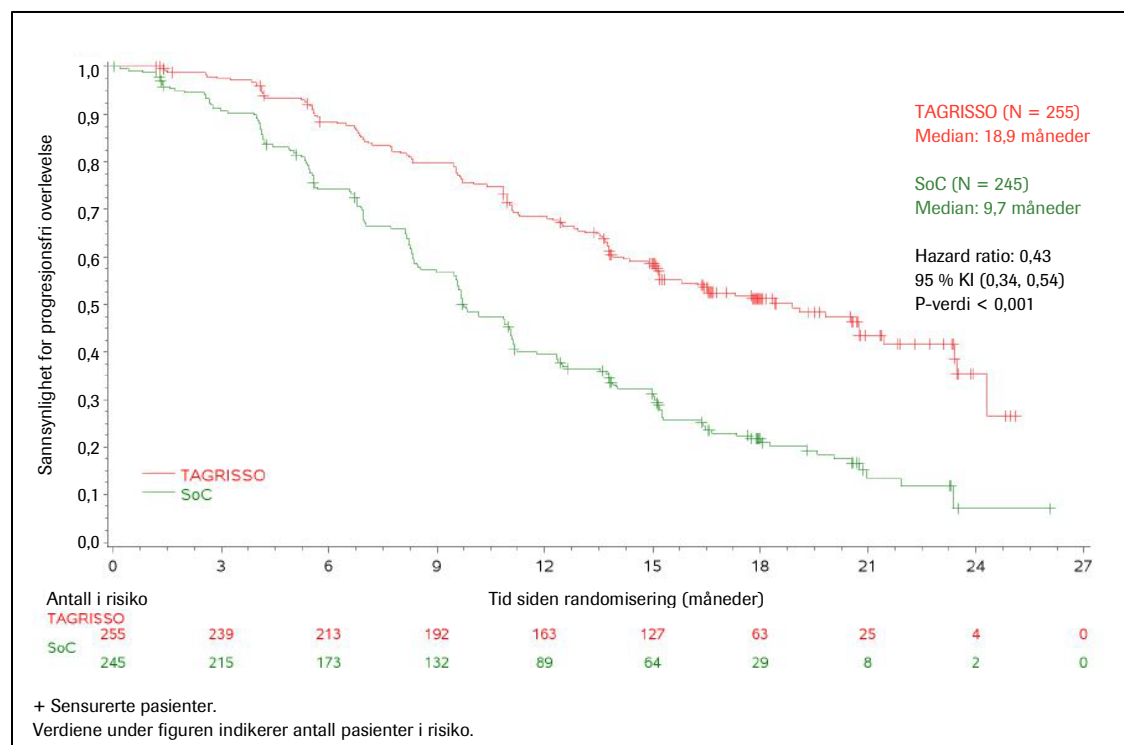
FLAURA-studien¹⁰ var en dobbeltblindet, randomisert klinisk studie i fase III, som vurderte effekten og sikkerheten ved bruk av TAGRISSO® sammenlignet med standardbehandling (SoC: EGFR-TKI [enten gefitinib eller erlotinib]) som førstelinjebehandling hos pasienter med lokalt fremskreden eller metastatisk NSCLC, som ikke tidligere hadde fått systemisk behandling for fremskreden sykdom, og med tumorer som hadde lokalt eller sentralt bekreftede sensitiverende mutasjoner i EGFR, Ex19del- eller L858R-substitusjonsmutasjoner, samlet omtalt som EGFRm-positive. Det primære endepunktet for FLAURA-studien var progresjonsfri overlevelse (PFS) basert på utprøvers vurdering for pasienter i det komplette analysesettet (FAS: alle globalt randomiserte pasienter).

Til sammen 994 pasienter ble screenet for randomisering i studien, og av disse hadde 809 pasienter tumorvevsprøver som ble testet med en sentral **cobas** EGFR-test, enten prospektivt ved screening eller retrospektivt. Av de 556 randomiserte pasientene (289 randomisert basert på den sentrale **cobas**-vevstesten og 267 randomisert basert på en lokal test) ble 500 pasienter bekreftet med et positivt testresultat med den sentrale **cobas** EGFRm-testen. Av de 267 pasientene som var randomisert basert på en lokal test, hadde 211 pasienter et bekreftet positivt resultat med den sentrale **cobas** EGFRm-testen, 41 pasienter hadde ingen resultater med **cobas**-testen grunnet ingen/inadekvat prøve, 9 pasienter hadde et ugyldig resultat med **cobas**-testen, og 6 pasienter hadde testresultatet "No Mutation Detected" med **cobas**-testen.

Tabell 20 nedenfor viser HR for progresjonsfri overlevelse (PFS) ved utprøvers vurdering for det komplette analysesettet og den primære analysepopulasjonen (pasienter med et positivt resultat med den sentrale **cobas** vevs-EGFRm-testen). HR for progresjonsfri overlevelse (PFS) ved utprøvers vurdering for det komplette analysesettet (N = 556), basert på en stratifisert log-rank-test, var 0,46 (95 % KI: 0,37, 0,57). Det samme punktestimatet ble oppnådd fra en ikke-justert Cox Proportional Hazards-modell. HR for progresjonsfri overlevelse (PFS) ved utprøvers vurdering for den primære analysepopulasjonen (N = 500), beregnet fra en ikke-justert Cox Proportional Hazards-modell, var 0,43 (95 % KI: 0,34, 0,54). Den kliniske effekten som ble observert i den primære analysepopulasjonen, stemte overens med den som ble observert i det komplette analysesettet. Kaplan-Meier-kurven for progresjonsfri overlevelse (PFS) ved utprøvers vurdering i den primære analysepopulasjonen vises i Figur 4.

Tabell 20 Progresjonsfri overlevelse ved utprøvers vurdering for det komplette FLAURA-analysesettet og for den primære analysepopulasjonen (positiv med cobas EGFR-testen)

	Komplett FLAURA-analysesett N = 556		Positiv populasjon med cobas EGFR-testen i FLAURA-studien (primær analysepopulasjon) N = 500	
	Osimertinib (N = 279)	Gefitinib eller erlotinib (N = 277)	Osimertinib (N = 255)	Gefitinib eller erlotinib (N = 245)
Progresjonsfri overlevelse (PFS)				
Antall hendelser (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Median progresjonsfri overlevelse (PFS) i måneder (95 % KI)	18,9 (15,2, 21,4)	10,2 (9,6, 11,1)	18,9 (15,2, 21,4)	9,7 (9,5, 11,0)
Hazard ratio (95 % KI) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
2-sidig p-verdi ^a	< 0,0001		< 0,001	

^aIkke-justert Cox Proportional Hazards-modell**Figur 4** Kaplan-Meier-plott for progresjonsfri overlevelse (PFS) per behandling for pasienter som fikk resultatet "Mutation Detected" med cobas EGFR-testen (utprøvers vurdering) i FLAURA-studien

II. Analyse av standardbehandling med IRESSA®

Det ble utført en separat analyse av tEGFR+-pasienter behandlet med IRESSA® (gefitinib) i kontrollgruppen av FLAURA-studien. Av til sammen 178 IRESSA®-behandlede pasienter hadde 174 en utprøvervurdert objektiv respons [ORR=67,8 % (118/174, 95 % KI: 60,6 %, 74,3 %, POP0 i Tabell 21)].

Av de 79 pasientene som ble behandlet med IRESSA® og randomisert med en sentral **cobas**-vevstest (den primære effektpopulasjonen), hadde 57 en objektiv respons med ORR på 72,2 % (95% KI: 61,4 %, 80,8 %, POP1 i Tabell 21).

Behandlingseffekten av IRESSA®, basert på **cobas**-vevstesten, ble opprettholdt over andre pasientpopulasjoner med ORR i området fra 64,2 % (POP2, innrullert i lokal test og også **cobas** tEGFR+-pasienter) til 68,5 % (POP3, alle **cobas** tEGFR+-pasienter) (Tabell 21 og Figur 5). Disse resultatene stemmer overens med resultatene som ble rapportert for den opprinnelige registreringsstudien (IFUM) for pasienter utvalgt for IRESSA®.¹³

Tabell 21 ORR-resultater for ulike pasientpopulasjoner basert på cobas EGFR-testen i vev

Objektiv respons	Randomiserte pasienter i SoC-gruppen behandlet med IRESSA®				
	Sentralt randomiserte (cobas tEGFR+)	Lokalt randomiserte (lokal tEGFR+)			Totalt
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Ugyldig/ukjent	
Antall pasienter	79	70	2	23	174
Respons	57	45	1	15	118
Ikke-respons	22	25	1	8	56
ORR (% , 95 % KI)	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 %)		-	-	-

Merk: Pasienter uten objektiv respons ble utelukket.

Merk: tEGFR = vevs-EGFR; KI = (skår) konfidensintervall.

POP = Populasjon (undergruppe)

POP1: ORR for pasienter randomisert med **cobas**-vevstesten (primær effektpopulasjon for **cobas**-vevstesten).

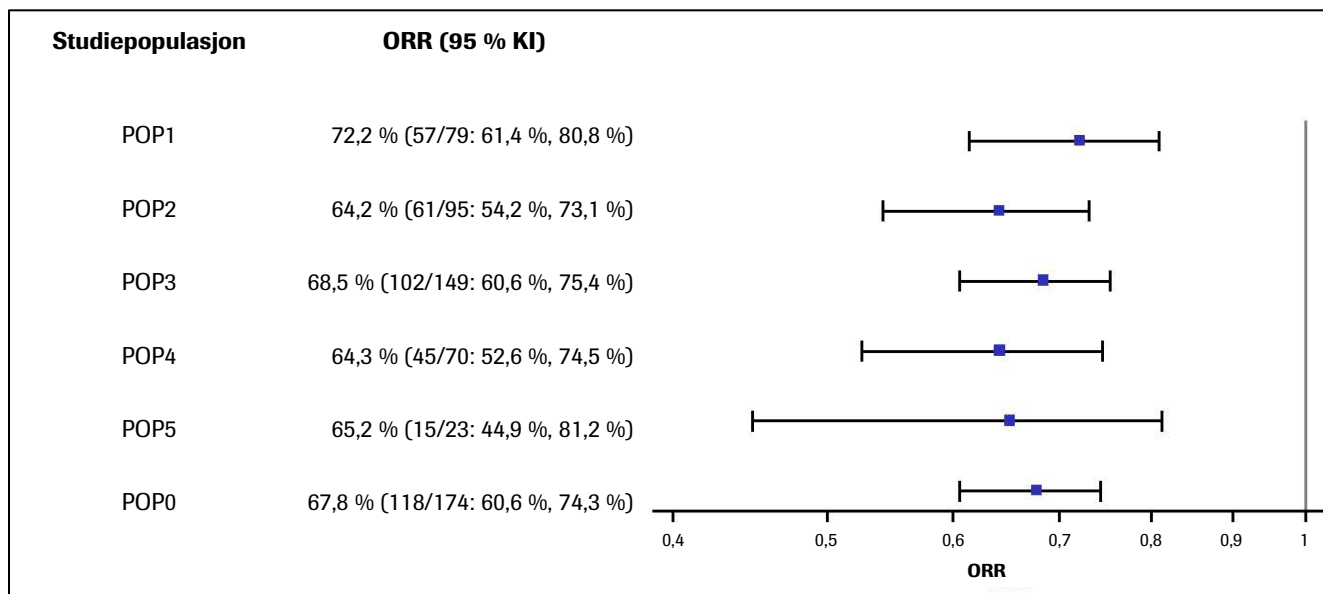
POP2: ORR for pasienter randomisert med en lokal vevstest.

POP3: ORR for pasienter som var positive med **cobas**-vevstesten.

POP4: ORR for pasienter som var randomisert med en lokal vevstest og bekreftet med **cobas**-vevstesten.

POP5: ORR for pasienter som var randomisert med en lokal vevstest, som ikke var testet med eller som hadde et ugyldig resultat for **cobas**-vevstesten.

POP0: ORR for alle pasienter behandlet med IRESSA®.

Figur 5 Forest-plott for ORR basert på cobas EGFR-testen i vev for ulike populasjoner

POP = Populasjon (undergruppe)

POP1: ORR for pasienter randomisert med **cobas**-vevstesten (primær effektpopulasjon for **cobas**-vevstesten).

POP2: ORR for pasienter randomisert med en lokal vevstest.

POP3: ORR for pasienter som var positive med **cobas**-vevstesten.

POP4: ORR for pasienter som var randomisert med en lokal vevstest og bekreftet med **cobas**-vevstesten.

POP5: ORR for pasienter som var randomisert med en lokal vevstest, som ikke var testet med eller som hadde et ugyldig resultat for **cobas**-vevstesten.

POP0: ORR for alle pasienter behandlet med IRESSA®.

AVSNITT B: FOR BRUK MED PLASMAPRØVER

Prøvepreparering

Se cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) for hvordan DNA isoleres fra plasmaprøver.

Materiell og reagenser

Materiell og reagenser som medfølger

Kit/kassetter	Komponenter og reagensingredienser	Antall per test	Sikkerhetssymbol og advarsel
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 tester (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N: 06471366001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase)-enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerte EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N: 06471382001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase) enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerte EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A

Kit/kassetter	Komponenter og reagensingredienser	Antall per test	Sikkerhetssymbol og advarsel
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 tester (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N: 07248601001) Tris-buffer Kaliumklorid Glyserol EDTA Tween 20 3,13 % dimetylsulfoksid 0,09 % natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1 DNA-polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase (uracil-N-glykosylase) enzym (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % oppstrøms og nedstrøms EGFR-primere < 0,01 % fluoroformerte EGFR-prober	2 × 0,48 ml	N/A
	MGAC (Magnesiumacetat) (M/N: 05854326001) Magnesiumacetat 0,09 % natriumazid	6 × 0,2 ml	N/A
	EGFR MC (EGFR mutantkontroll) (M/N: 06471455001) Tris-buffer EDTA Poly-rA RNA (syntetisk) 0,05 % natriumazid < 0,1 % plasmid-DNA som inneholder EGFR-ekson 18-, 19-, 20- og 21-sekvenser (mikrobiell) < 0,1 % EGFR villtype-DNA (cellekultur)	6 × 0,1 ml	N/A
	DNA SD (DNA-fortynningsløsning) (M/N: 05854474001) Tris-HCl-buffer 0,09 % natriumazid	2 × 3,5 ml	N/A

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Reagens	Oppbevaringstemperatur	Oppbevaringstid
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2 °C til 8 °C	Etter åpning er reagensene stabile for bruk opptil 4 ganger over 90 dager eller til angitt utløpsdato, avhengig av hva som kommer først.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** og Working Master Mix (tillages ved tilsetning av **MGAC** til **EGFR MMX-1** eller **EGFR MMX-2** eller **EGFR MMX-3 v2**) skal beskyttes mot langvarig eksponering for lys. Working Master Mix skal oppbevares mørkt ved 2 °C til 8 °C. Preparerte prøver og kontroller må tilsettes innen 1 time fra tidspunktet Working Master Mix ble tillaget. Amplifikasjon må startes innen 1 time fra tidspunktet for tilsetning av de behandlede prøvene og kontrollene i Working Master Mix.

Ytterligere materiell som kreves

Materiell	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Blekemiddel	Forskjellige leverandører
70 % etanol	Forskjellige leverandører
Sterile, serologiske pipetter for engangsbruk, 5 og 25 ml	Forskjellige leverandører
Mikrobrønnplate (AD-plate) og forseglingsfilm for cobas® 4800-systemet	Roche 05232724001
Forseglingsfilmappikator for cobas® 4800-systemet (leveres med cobas® 4800-systemet)	Roche 04900383001
Justerbare pipetter* (kan pipettere 5–1000 µl)	Forskjellige leverandører
Aerosolbarriere eller “positive displacement” DNase-frie pipettespisser	Forskjellige leverandører
Mikrosentrifuge* (med kapasitet på 20 000×g)	Eppendorf 5430 eller 5430R eller tilsvarende
Fryser med mulighet for oppbevaring i -25 °C til -15 °C	Forskjellige leverandører
Mikrosentrifugerør med låsbart lokk (1,5 ml RNase/DNase-frie/ PCR-kvalitet)	Forskjellige leverandører
Stativer til koniske rør og mikrosentrifugerør	Forskjellige leverandører
Vortexmikser*	Forskjellige leverandører
Pudderfrie engangshansker	Forskjellige leverandører

* Alt utstyr må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner.

Hvis du ønsker mer informasjon om materiell som selges separat, kan du ta kontakt med din lokale Roche-representant.

Instrumentering og programvare som kreves, men som ikke medfølger

Nødvendig instrumentering og programvare som ikke medfølger
cobas® z 480-analysator
cobas® 4800-systemets kontrollenhet med systemprogramvareversjon 2.2 eller nyere
EGFR Plasma P1 plasmaanalysepakke, programvareversjon 1.0 eller nyere*
Strekkodeleser USB-utg.
Skriver

* Se produktinformasjonskortet for **cobas®** EGFR Mutation Test v2 kit (M/N: 07335873001) for gjeldende programvareversjon.

Hvis du ønsker mer informasjon om materiell som selges separat, kan du ta kontakt med din lokale Roche-representant.

Krav til oppbevaring og håndtering

Advarsler og forholdsregler

Som med alle laboratorieprosedyrer er god laboratoriepraksis essensielt for å sikre optimal ytelse for denne analysen.

- Kun for bruk til *in vitro*-diagnostikk
- Sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig fra ditt lokale Roche kontor etter forespørsel.
- Denne testen skal brukes til NSCLC-plasmaprøver. Prøver må håndteres som potensielt infeksiose, og gode laboratorierutiner må følges. Disse er beskrevet i Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ og i CLSI-dokumentet M29-A4.¹⁷
- Bruk av sterile engangspipetter og DNase-frie pipettespisser anbefales.

God laboratoriepraksis

- Ikke pipetter med munnen.
- Ikke spis, drikk eller røyk i laboratoriets arbeidsområder.
- Vask hendene nøye etter håndtering av prøver og reagenser.
- Bruk vernebriller, laboratoriefrakk og engangshansker ved håndtering av reagenser. Unngå kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Skyll umiddelbart med store mengder vann hvis slik kontakt oppstår. Hvis kontaktstedet ikke blir behandlet, kan det oppstå brannskade. Fortynn med vann før du tørker opp eventuelt søl.
- Rengjør og desinfiser alle arbeidsoverflater nøye med en nylaget løsning av 0,5 % natriumhypokloritt i destillert eller de-ionisert vann (fortynn klor til husholdningsbruk i forholdet 1:10). Tørk deretter av overflaten med 70 % etanol.

Merk: *Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortynning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.*

Kontaminering

- Hansker må brukes, og de må byttes mellom håndtering av prøver og **cobas** EGFR-testreagenser for å unngå kontaminering. Unngå kontaminering av hanskene når prøver håndteres.
- Hansker må byttes ofte for å redusere risiko for kontaminering.
- Hansker må byttes før DNA-isoleringsområder forlates, eller hvis det er mistanke om kontakt med løsninger eller en prøve.
- Unngå mikrobiell kontaminering og ribonukleasekontaminering av reagenser.
- Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. Forbruksmateriell og utstyr skal være dedikert for hver preamplifikasjonsaktivitet og skal ikke brukes til andre aktiviteter eller flyttes mellom områdene. For eksempel må pipetter og forbruksmateriell som brukes til DNA-isolering ikke brukes til å klargjøre reagenser for amplifikasjon og deteksjon.
- Det anbefales sterkt at arbeidsflyten på laboratoriet er unidireksjonal, dvs. at man avslutter en aktivitet før man går videre til neste aktivitet. For eksempel skal DNA-isolering være fullført før du begynner med amplifikasjon og deteksjon. DNA-isolering skal utføres i et annet område enn amplifikasjon og deteksjon. For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal arbeidsområdet for amplifikasjon og deteksjon rengjøres grundig før tillaging av Working Master Mix.

Integritet

- Kit må ikke brukes etter utløpsdatoen.
- Reagenser fra ulike kit eller lot må ikke slås sammen.
- Bruk ikke forbruksmateriell etter utløpsdato.
- Alt forbruksmateriell er laget for bare å brukes én gang. Skal ikke gjenbrukes.
- Alt utstyr må vedlikeholdes i samsvar med produsentens instruksjoner.

Kassering

- DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC og DNA SD inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberør og danne svært eksplosive metallazider. Hvis løsninger som inneholder natriumazid, helles ned i avløp i laboratoriet, må de skylles ned med store mengder kaldt vann for å unngå opphopning av azider.
- Kast ubrukte reagenser og avfall i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk.

Søl og rengjøring

- Hvis det søles på cobas® 4800-instrumentet, må det rengjøres i samsvar med instruksjonene i operatørmanualen for det relevante cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet.
- Bruk ikke natriumhypoklorittløsning (klormiddel) til å rengjøre cobas® z 480-analysatoren. Rengjør cobas® z 480-analysatoren i samsvar med prosedyrene som er beskrevet i operatørmanualen for det relevante cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet.
- For ytterligere advarsler, forholdsregler og prosedyrer for å redusere risikoen for kontaminasjon av cobas® z 480-analysatoren henvises det til operatørmanualen for cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet.

Prøvetaking, -transport og -oppbevaring

Merk: Alle prøver må behandles som om de er potensielt smittebærende.

Prøvetaking og -håndtering

Roche Cell-Free DNA Collection Tube

Plasma fra fullblod i Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (Roche cfDNA-rør) har blitt validert for bruk med cobas EGFR-testen.

Plasma skal separeres fra blod i Roche cfDNA-røret innen 7 dager etter prøvetaking. Blodprøver i Roche cfDNA-røret er stabile i 7 dager når de oppbevares eller sendes ved 15–25 °C, med forbigående perioder på opptil 16 timer ved 15–30 °C. Etter separasjon av plasma skal røret oppbevares som angitt i avsnittet **Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver** nedenfor.

Merk: Hemolyse har blitt observert i plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret. Hemoglobinkonsentrasjoner på $\leq 2,0$ g/l har imidlertid blitt vist ikke å interferere med ytelsen til cobas EGFR-testen.

K2 EDTA-prøverør

Plasma fra fullblod i K2 EDTA-rør har blitt validert for bruk med cobas EGFR-testen.

K2 EDTA-fullblod kan oppbevares i opptil 8 timer ved ≤ 30 °C. Etter separasjon av plasma skal røret oppbevares som angitt i avsnittet **Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver** nedenfor.

Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver

Transport av plasmaprøver må skje i henhold til nasjonalt, regionalt og lokalt regelverk for transport av biologisk materiale.¹⁸

Plasmaprøver er holdbare i en av følgende tidsperioder:

Oppbevaringstemperatur for plasmaprøver	≤ -70 °C	-15 °C til -25 °C	2 °C til 8 °C	15 °C til 30 °C
Oppbevaringstid for Roche cfDNA-plasma	Opptil 30 dager	Opptil 30 dager	Opptil 7 dager	Opptil 1 dag
Oppbevaringstid for K2 EDTA-plasma	Opptil 12 måneder	Opptil 12 måneder	Opptil 3 dager	Opptil 1 dag

Stabilitet ved oppbevaring av behandlede prøver

Behandlet prøve (ekstrahert cfDNA) fra plasma fra Roche cfDNA-røret eller K2 EDTA-røret er stabil i ett av følgende:

Oppbevaringstemperatur for ekstrahert cfDNA	-15 °C til -25 °C	2 °C til 8 °C	15 °C til 30 °C
Oppbevaringstid	Opptil 2 fryse-tine-sykluser over 60 dager	Opptil 21 dager	Opptil 7 dager

Ekstrahert cfDNA skal brukes innenfor den anbefalte oppbevaringsperioden eller før utløpsdatoen til cobas® cfDNA Sample Preparation Kit som brukes til å ekstrahere DNA-et, avhengig av hva som kommer først.

Før man bruker ekstrahert, lagret DNA-konsentrater, må elueringsrøret med konsentratet pulsvortexes og sentrifugeres.

Testprosedyre

Testkjøring

Figur 6 Arbeidsflyt for cobas EGFR-testen med cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

1	Start systemet.
2	Utfør instrumentvedlikehold.
3	Ta ut prøver og reagenser fra lager.
4	Klargjør prøver for binding til kolonne.
5	Utfør DNA-isolering.
6	Eluer DNA.
7	Opprett arbeidsbestilling og skriv ut plateoppsett.
8	Klargjør amplifikasjonsreagenser.
9	Fyll AD-plate med amplifikasjonsreagenser.
10	Fyll AD-plate med prøve.
11	Forsegl AD-plate.
12	Last inn AD-plate i cobas® z 480 -analysator.
13	Start analyseserien.
14	Gjennomgå resultater.
15	Med LIS: send resultater til LIS-systemet.
16	Last ut av analysatoren.

Bruksanvisning

Merk: Kun plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret eller i et K2 EDTA-rør er validert for bruk med **cobas** EGFR-testen.

Merk: Se instrumentmanualen for **cobas® z 480**-analysatoren for detaljert bruksanvisning for **cobas® z 480**-analysatoren.

Størrelse på analyseserier

En enkel analyseserie kan inkludere fra 1 til 30 prøver (pluss kontroller) per 96-brønns AD-plate. Ved analyse av mer enn 24 prøver, må det brukes flere **cobas** EGFR-testkit.

cobas EGFR-testkitet inneholder tilstrekkelig med reagenser for 8 analyseserier av 3 prøver (pluss kontroller) for maksimalt 24 prøver per kit.

Full prosesskontroll

Denne testen krever en full negativ prosesskontroll. For hver analyseserie skal en negativ kontroll behandles samtidig med prøven(e) fra og med prosedyren for DNA-isolering.

DNA-isolering

DNA isoleres fra plasmaprøver ved bruk av **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

Amplifikasjon og deteksjon

Merk: For å unngå at Working Master Mix kontamineres med DNA-prøver, skal amplifikasjon og deteksjon utføres i et annet område enn der det utføres DNA-isolering. Arbeidsområdet der det utføres amplifikasjon og deteksjon, skal være fullstendig rengjort før tillaging av Working Master Mix. For å sikre tilstrekkelig rengjøring skal alle overflater, inkludert stativ og pipetter, tørkes grundig med en 0,5 % natriumhypoklorittløsning og deretter med en 70 % etanoløsning. Kommersielt tilgjengelig blekemiddel til husholdningsbruk inneholder normalt natriumhypokloritt med en konsentrasjon på 5,25 %. En fortynning i forholdet 1:10 med et slikt blekemiddel gir en 0,5 % natriumhypoklorittløsning.

Klargjøring av instrumentet

Se operatørmanualen for cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet for detaljerte instruksjoner om hvordan cobas® z 480-analysatoren konfigureres.

Klargjøring av testrekkefølge

For detaljerte instruksjoner om trinnene i EGFR-arbeidsflyten kan du se operatørmanualen for cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet.

Generer en plateoversikt med posisjonen til alle prøvene og kontrollene i analyseserien. I en analyseserie som kun inneholder plasmaprøver, tilsettes mutantkontrollen i posisjon **A01–A03** på platen. Den negative kontrollen tilsettes i posisjon **B01–B03** på platen. Prøver tilsettes deretter i sett à 3 kolonner, fra **C01–C03** til og med **H10–H12**, som vist i Figur 7.

cobas EGFR-testen kan kjøres i kombinert analysemodus (f.eks. EGFR-vev med EGFR-plasma). Kontrollposisjonen kan variere avhengig av hvilke analyser som er valgt, og av antall prøver. Se programvaremanualen for cobas® EGFR mutasjonstest v2 eller operatørmanualen for cobas® 4800-systemet eller brukerhjelpen for cobas® 4800-systemet for mer informasjon om hvordan du setter opp en kombinert analyseserie.

Figur 7 Plateoppsett for cobas EGFR-testen

Rad / kolonne	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

Der: MC = mutantkontroll, NEG = negativ kontroll S# = prøve-ID og MMX # tilsvarer Master Mix-reagens 1, 2 eller 3 v2.

Merk: En gitt prøve må fordeles over tre etterfølgende kolonner i én rad for å generere et svar.

Merk: Working Master Mix 1 må tilsettes i kolonne 01, 04, 07 og 10 på platen. Working Master Mix 2 må tilsettes i kolonne 02, 05, 08 og 11 på platen. Working Master Mix 3 v2 må tilsettes i kolonne 03, 06, 09 og 12 på platen.

Merk: Opptil 30 prøver kan tilsettes til én enkelt plate. Hvis det er nødvendig med mer enn ett reagenskit for å behandle alle prøvene på platen, må alle kitene være fra samme lot.

Klargjøring av reaksjoner

Tillaging av Working Master Mix (MMX-1, MMX-2 og MMX-3 v2)

Merk: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 og Working Master Mix er lysfølsomme og må beskyttes mot langvarig eksponering for lys.

Merk: Grunnet viskositeten til EGFR MMX-reagensene og Working Master Mix skal det pipetteres langsomt for å sikre at all blanding blir fullstendig dispensert fra spissen.

Merk: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 og EGFR MMX-3 v2 kan være lyseblå/lillaaktige. Dette påvirker ikke reagensenes ytelse.

Merk: Klargjør tre porsjoner med Working Master Mix, én som inneholder EGFR MMX-1, én som inneholder EGFR MMX-2 og én som inneholder EGFR MMX-3 v2 i separate 1,5 ml mikrosentrifugerør.

1. Beregn volumet av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 som trengs for hver Working Master Mix ved å bruke følgende formel:

$$\text{Volum av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 som trengs} = (\text{antall prøver} + 2 \text{ kontroller} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Beregn volumet av MGAC som trengs for hver Working Master Mix ved å bruke følgende formel:

$$\text{Volum av MGAC som trengs} = (\text{antall prøver} + 2 \text{ kontroller} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Bruk Tabell 22 for å bestemme volumer av hvert reagens som trengs for tillaging av Working Master Mix basert på antall prøver i analyseserien.

Tabell 22 Volumer av reagenser som trengs for Working MMX-1, Working MMX-2 og Working MMX-3 v2

		Antall prøver*									
		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
Totalvolum for hver Working Master Mix (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Volumer for antall prøver er basert på summen av antall prøver + 2 kontroller + 1

3. Ta ut riktig antall flasker med EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 og MGAC fra kjølelageret på 2 °C til 8 °C. Vortex hvert reagens i 5 sekunder for å samle væsken i bunnen av røret før bruk. Merk et sterilt mikrosentrifugerør for Working Master Mix-1, Working Master Mix-2 og Working Master Mix-3 v2.
4. Tilsett det beregnede volumet av EGFR MMX-1 eller EGFR MMX-2 eller EGFR MMX-3 v2 til deres respektive rør med Working Master Mix.
5. Tilsett beregnet volum av MGAC til rørene med Working Master Mix.
6. Vortex rørene i 3 til 5 sekunder for å sikre tilstrekkelig blanding.

Merk: Prøver og kontroller skal tilsettes AD-platen innen 1 time etter tillaging av Working Master Mix.

Merk: Bruk kun AD-plate og forseglingsfilm for **cobas®** 4800-systemet.

Klargjøring av plate

Merk: Hvis det brukes DNA-konsentrater som har vært lagret, må instruksjonene i avsnittet **Transport, oppbevaring og stabilitet av prøver** følges.

1. Pipetter 25 µl Working Master Mix i hver reaksjonsbrønn på AD-platen som trengs for analyseserien. Ikke la pipettespissen berøre platen utenfor brønnen.
 - Tilsett Working Master Mix-1 (som inneholder **EGFR MMX-1**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 01, 04, 07 og 10, etter behov.
 - Tilsett Working Master Mix-2 (som inneholder **EGFR MMX-2**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 02, 05, 08 og 11, etter behov.
 - Tilsett Working Master Mix-3 v2 (som inneholder **EGFR MMX-3 v2**) til brønnene på AD-platen i kolonnene 03, 06, 09 og 12, etter behov.
2. Pipetter 25 µl **EGFR MC** i brønnene **A01**, **A02** og **A03** på AD-platen. Bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.
3. Bruk en ny pipettespiss og pipetter 25 µl **NEG** i brønnene **B01**, **B02** og **B03** på AD-platen. Bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger.

Merk: Hver analyseserie må inneholde **EGFR MC** i brønn **A01**, **A02** og **A03**, og **NEG** i brønn **B01**, **B02** og **B03**, ellers blir analyseserien gjort ugyldig av **cobas® z 480**-analysatoren.

Merk: Bytt hansker ved behov for å forebygge kontaminasjon fra prøve til prøve og kontaminasjon av utsiden av PCR-reaksjonsrøret.

4. Bruk nye pipettespisser for hvert prøve-DNA og tilsett 25 µl av det første prøve-DNA-et til brønn **C01**, **C02** og **C03** på AD-platen. Bruk en ny pipettespiss for å tilsette prøve-DNA i hver brønn, og bland godt ved å pipettere opp og ned i brønnen minst to ganger. Gjenta denne prosedyren for DNA-et for hver prøve, og følg malen i Figur 7 til alt DNA er fylt på AD-platen. Sørg for at all væske er samlet i bunnen av brønnene.

Merk: Før man bruker lagret DNA-konsentrater, må elueringsrøret med konsentratet pulsvortexes og sentrifugeres.

5. Dekk AD-platen med forseglingsfilm (leveres med platene). Bruk forseglingsfilmapplikatoren til å forsegle filmen godt til AD-platen.
6. Kontroller at all væske er samlet i bunnen av hver brønn før du starter PCR.

Merk: Amplifikasjon og deteksjon skal startes innen 1 time etter at den første prøve-DNA-fortynningen ble tilsatt i Working Master Mix.

Starte PCR

Se operatørmanualen for **cobas®** 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas®** 4800-systemet for detaljerte instruksjoner om trinnene i EGFR-arbeidsflyten. Når vinduet "Select test" vises, skal du velge "EGFR Plasma P1" og klikke på knappen "OK".

Resultater

Tolkning av resultater

Merk: All analyseserie- og prøvevalidering utføres av **cobas®** 4800-programvaren.

Merk: En gyldig analyseserie kan omfatte både gyldige og ugyldige prøveresultater.

Prøveresultater fra en gyldig analyseserie tolkes som vist i Tabell 23.

Tabell 23 Tolkning av resultater for cobas EGFR-testen

Testresultat	Mutasjonsresultat	Resultat for semikvantitativ indeks (SQI)	Tolkning
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Mer enn én mutasjon kan forekomme)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (Mer enn én mutasjon kan forekomme)	Mutasjon detektert i spesifisert EGFR-målregion.
No Mutation Detected (NMD)*	N/A	N/A	Mutasjon ikke detektert i spesifiserte EGFR-målregioner
Invalid	N/A	N/A	Prøveresultat er ugyldig. Gjenta testing av prøver med ugyldige resultater i samsvar med instruksjonene i avsnittet “Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater” .
Failed	N/A	N/A	Mislykket grunnet feil ved maskinvare eller programvare. Kontakt ditt lokale Roche-kontor for teknisk støtte.

* Et “No Mutation Detected”-resultat utelukker ikke tilstedeværelse av en mutasjon i EGFR-målregionene, fordi resultatene avhenger av konsentrasjon av mutantsekvenser, tilstrekkelig god prøveintegritet, fravær av hemmere og tilstrekkelig med DNA til å kunne detekteres.

Du finner resultatflagg på fanen “Results” (skjerm bilde) eller i kolonnen “Flags” (rapport). Se avsnittet **Resultatflagg** for mer informasjon.

Semikvantitativ indeks (SQI)

SQI er et semikvantitativt mål for mengden mutant-cfDNA i en prøve som kan brukes til å måle forskjeller i mutasjonsmengde over tid. En økning i SQI-verdien indikerer en økning i mengden tilsvarende målmutasjon innenfor en individuell prøvekilde, mens en reduksjon i SQI-verdien indikerer en reduksjon i den generelle mengden tilsvarende målmutasjon innenfor en individuell prøvekilde. Representative SQI-resultater for hver EGFR-mutasjonsklasse som detekteres av testen, vises i linearitetsresultatene i Figur 8 – Figur 14.

Gjentatt testing av prøver med ugyldige resultater

1. Hvis analyseserien er ugyldig, vil det ikke være et tilstrekkelig volum av ekstrahert DNA for hver prøve til å kunne gjenta amplifikasjon og deteksjon. Gjenta hele testprosedyren for alle prøver ved å starte med DNA-isolering.
2. Hvis analyseserien er gyldig, men prøven er ugyldig, vil det ikke være et tilstrekkelig volum av ekstrahert DNA for hver prøve til å kunne gjenta amplifikasjon og deteksjon. Gjenta hele testprosedyren for den ugyldige prøven ved å starte med DNA-isolering.

Kvalitetskontroll og gyldighet av resultater

Ett sett med **cobas** EGFR test mutantkontroll (**EGFR MC**) (brønn **A01**, **A02** og **A03**) og negativ kontroll (**NEG**) (brønn **B01**, **B02** og **B03**) for Working Master Mix-1, Working Master Mix-2 og Working Master Mix-3 v2 er inkludert i hver analyseserie for opptil 30 prøver. En analyseserie er gyldig hvis **EGFR MC** og **NEG** er gyldige. Hvis en **EGFR MC** eller **NEG** er ugyldig, blir hele analyseserien ugyldig og må gjentas.

Mutantkontroll

Resultatet for **EGFR MC** må være "Valid" (gyldig). Hvis **EGFR MC**-resultatene konsekvent er ugyldige, må du kontakte det lokale Roche-kontoret for teknisk assistanse.

Negativ kontroll

Resultatet for **NEG** må være "Valid" (Gyldig). Hvis **NEG**-resultatene konsekvent er ugyldige, må du kontakte det lokale Roche-kontoret for teknisk assistanse.

Testens begrensninger

1. Test kun de angitte prøvematerialene. **cobas** EGFR-testen har blitt validert for bruk med plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret eller et K2 EDTA-rør.
2. Ytelsen til **cobas** EGFR-testen er validert ved bruk av **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit.
3. Deteksjon av en mutasjon er avhengig av antallet kopier som er til stede i prøven, og kan påvirkes av prøvens integritet, mengden isolert DNA og tilstedeværelse av interfererende substanser.
4. Pålitelige resultater er avhengig av adekvat transport, oppbevaring og håndtering. Følg prosedyrene i denne bruksanvisningen og i operatørmanualen for **cobas**® 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas**® 4800-systemet.
5. Pipettering fra bunnen av elueringsrøret kan ødelegge pelleten og redusere testresultatenes pålitelighet.
6. Tilsetning av AmpErase-enzym i **cobas** EGFR-testens Master Mix muliggjør selektiv amplifikasjon av mål-DNA. Kontaminering av reagensene kan imidlertid bare unngås gjennom gode laboratorierutiner og ved å følge prosedyrene som er spesifisert i denne bruksanvisningen nøye.
7. Dette produktet må kun brukes av personell som har fått opplæring i PCR-teknikker og i bruken av **cobas**® 4800-systemet.
8. Dette produktet er kun validert for bruk med **cobas**® z 480-analysatoren. Ingen annen termocycler med optisk sanntidsdeteksjon kan brukes sammen med dette produktet.
9. På grunn av iboende forskjeller mellom teknologier anbefales det at brukerne utfører metodekorrelasjonsstudier i laboratoriet for å bestemme de teknologiske forskjellene før en ny teknologi tas i bruk.
10. Tilstedeværelsen av PCR-hemmere kan føre til falske negative eller ugyldige resultater.
11. Selv om det er sjelden, kan mutasjoner innenfor de genomiske DNA-regionene i EGFR-genet som **cobas** EGFR-testens primere og/eller prober er rettet mot, resultere i manglende evne til å detektere forekomst av en mutasjon i ekson 18, 19, 20 og 21 (resultat "No Mutation Detected").

12. **cobas** EGFR-testen viser kryssreaktivitet (resultat “Mutation Detected”) for L747S-mutasjonen i ekson 19, en sjelden ervervet mutasjon som kan medføre resistens mot TKI-behandling.¹⁹
13. Prøver testet ved høye konsentrasjoner ($> 10^5$ kopier/ml) kan generere falske resultater.
14. **cobas** EGFR-testen er validert for bruk med 25 µl DNA-konsentrat per reaksjonsbrønn. Innmatingsvolumer for DNA-konsentrat lavere enn 25 µl per reaksjonsbrønn anbefales ikke.
15. Prosedyren beskrevet ovenfor må følges for å detektere ≥ 100 kopier mutant DNA per ml plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret eller i et K2 EDTA-rør for EGFR-mutasjonene i Tabell 3.
16. Prøver med resultater som rapporteres som “No Mutation Detected”, kan inneholde EGFR-mutasjoner som ikke detekteres av analysen.
17. Det må vurderes om et “No Mutation Detected”-resultat i plasma skal gjentas eller bekreftes med vevstesting.
18. Plasmaet fra fullblod i Roche cfDNA-røret er kun nok til én test.
19. Plasma fra pasientprøver som ikke er tatt samtidig, skal ikke kombineres.
20. Ytelsen til **cobas** EGFR-testen har ikke blitt fastslått med koagulerte prøver innhentet med Roche cfDNA-røret. Koagulerte prøver skal avvises, og det skal tas en ny prøve fra pasienten.
21. Hemolyse har blitt observert i plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret. Hemoglobinkonsentrasjoner på $> 2,0$ g/l kan interferere med ytelsen til **cobas** EGFR-testen.

Evaluering av analytisk ytelse

Analytisk ytelse

Følgende data er ment å vise den analytiske ytelsen til **cobas** EGFR-testen.

Analytisk sensitivitet – blankgrense

For å vurdere ytelsen til **cobas** EGFR-testen i fravær av templat og for å sikre at en blankprøve ikke genererer et analytisk signal som kan indikere en lav mutasjonskonsentrasjon, ble friske K2 EDTA-donorplasmaprøver av EGFR-villtype evaluert. Ved bruk av analysen som er beskrevet i retningslinjen CLSI EP17-A2²⁰, ble blankgrensen bestemt til å være null for alle mutasjoner.

Deteksjonsgrense ved bruk av cellelinje-DNA

K2 EDTA-plasma

Cellelinje-DNA som inneholdt hver av de sju mutasjonsklassene som detekteres med testen, ble tilsatt til friskt K2 EDTA-donorplasma, som var villtype for EGFR. Serielle fortynninger ble tillaget, og 24 replikater av hver panelprøve ble testet ved bruk av 3 **cobas** EGFR-testkitloter.

Deteksjonsgrense ble bestemt for hver av de sju mutasjonsklassene som detekteres med testen, som den laveste konsentrasjonen av DNA som ga en EGFR “Mutation Detected”-rate på minst 95 % for målmutasjonen. Resultatene vises i Tabell 24.

Tabell 24 Deteksjonsgrense for cobas EGFR-testen med K2 EDTA-plasma

EGFR-ekson	EGFR-mutasjonsgruppe	EGFR-nukleinsyresekvens	Intakt* DNA-LoD (kopier/ml)	Kuttet** DNA-LoD (kopier/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

Forskjellene i observert LoD skyldes forskjellen i bakgrunns-DNA.

* Intakt cellelinje-DNA hadde en villtype-DNA-bakgrunn på ca. 10 000 kopier/ml.

** Cellelinje-DNA, mekanisk kuttet til en gjennomsnittsstørrelse på 220 bp, hadde en villtype-DNA-bakgrunn på ca. 100 000 kopier/ml.

Roche cfDNA-plasma

Når det gjelder plasma separert fra blod i Roche cfDNA-røret, ble LoD-verdiene verifisert ved å tilsette kuttet cellelinje-DNA som inneholdt hver av de sju mutasjonsklassene som detekteres med testen, til friskt Roche cfDNA-donorplasma, som var villtype for EGFR. Fortynninger ble tillaget med LoD-konsentrasjonene angitt i Tabell 24, og 20 replikater for hver prøve ble testet med én **cobas** EGFR-testkitlot. Den observerte treffraten for hver mutasjon var 100 %.

Totalt sett kan **cobas** EGFR-testen detektere mutasjoner i EGFR-ekson 18, 19, 20 og 21 med ≤ 100 kopier av mutant DNA per ml plasma ved bruk av standardinnmating på 25 μ l DNA-konsentrat per reaksjonsbrønn med enten K2 EDTA- eller Roche cfDNA-plasma.

Kryssreaktivitet til andre mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21

Prøver fra AURA-forlengelsesstudien og den kliniske AURA2-studien

cobas EGFR-testen ga resultatet “Mutation Detected” for følgende EGFR-mutasjoner observert i prøvene fra AURA-forlengelsesstudien og den kliniske AURA2-studien (Tabell 25). AURA-forlengelsesstudien ble brukt for å supplere prøvene i AURA2-kohorten og øke sannsynligheten for å detektere sjeldne mutasjoner i plasma. Den analytiske ytelsen til cobas EGFR-testen ved deteksjon av disse mutasjonene er ikke blitt evaluert.

Tabell 25 Mutasjoner observert i AURA-forlengelsesstudien og AURA2-studien som ble påvist å kryssreagere med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Ikke funnet
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Ikke funnet
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Ikke funnet

Spesifisitet – mikroorganisme

Spesifisiteten til cobas EGFR-testen ble evaluert ved å teste *Staphylococcus epidermidis* ved 1×10^6 kolonidannende enheter, som ble funnet ikke å kryssreagere eller interferere med cobas EGFR-testen når den ble tilsatt i friske K2 EDTA-donorplasmaprøver som inneholdt villtype- og mutant-EGFR-sekvenser.

Interferens

K2 EDTA-plasma

Triglyserider (37 mM, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹), 0,2 g/l bilirubin (ukonjugert eller konjugert, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹) og hemoglobin (1,5 g/l) viste seg ikke å interferere med cobas EGFR-testen når den potensielt interfererende substansen ble tilsatt i friske K2 EDTA-donorplasmaprøver som inneholdt villtype- og mutant-EGFR-sekvenser. Hemoglobin ved en konsentrasjon på 2,0 g/l i plasma viste seg å interferere med cobas EGFR-testen. Albumin ved en konsentrasjon på ≥ 60 g/l (60 g/l, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹) kan interferere med cobas EGFR-testen.

Studieresultatene viser at EDTA, Neupogen og TARCEVA® ikke interfererer med ytelsen til cobas EGFR-testen når den potensielt interfererende substansen ble tilsatt i friske K2 EDTA-donorplasmaprøver som inneholdt villtype- og mutant-EGFR-sekvenser.

Roche cfDNA-plasma

Triglyserider (37 mM, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹), 0,2 g/l bilirubin (ukonjugert eller konjugert, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹), hemoglobin (2,0 g/L) og albumin (60 g/L, CLSI-anbefalt høy konsentrasjon²¹) viste seg ikke å interferere med cobas EGFR-testen når den potensielt interfererende substansen ble tilsatt i friskt Roche cfDNA-donorplasma som inneholdt villtype- og mutant-EGFR-sekvenser.

Linearitet

K2 EDTA-plasma

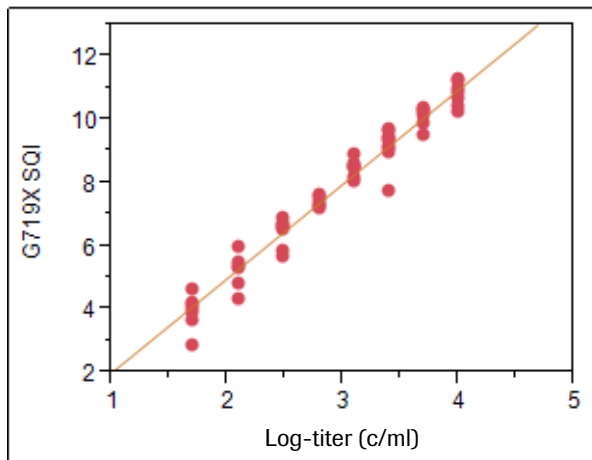
Linearitetsstudien for **cobas** EGFR-testen ble utført med en fortynningsserie på minst 8 panelprøver over hele linearitetsområdet for den dominerende mutasjonen for hver EGFR-mutasjonsklasse som rapporteres med testen. Panelprøver ble tillaget ved å fortynne cellelinje-DNA bestående av dominerende mutasjoner i friskt K2 EDTA-donorplasma, som er villtype for EGFR. Evalueringen ble utført i samsvar med CLSI-retningslinjen EP-06A.²⁴ Ti replikater per panelprøve for 2 forskjellige loter ble testet for konsentrasjoner opp til 1,0E+04 kopier/ml (totalt 20 replikater per nivå). Over 1,0E+04 kopier/ml ble ett replikat per lot testet.

Linearitetsområdet for hver mutasjonsklasse i **cobas** EGFR-testen er angitt i Tabell 26, og de tilsvarende grafene for én lot vises i Figur 8 til og med Figur 14.

Tabell 26 Linearitetsområde for cobas EGFR-testen med K2 EDTA-plasma

EGFR-ekson	EGFR-mutasjon	Målnukleinsyresekvens	Linearitetsområde (kopier/ml)
18	G719A	2156G>C	50–1E+04
19	Ekson 19-delesjon	2235_2249del15	10–1E+05
20	S768I	2303G>T	10–1E+05
20	T790M	2369C>T	50–1E+05
20	Ekson 20-innskudd	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10–1E+05
21	L858R	2573T>G	10–1E+05
21	L861Q	2582T>A	10–1E+05

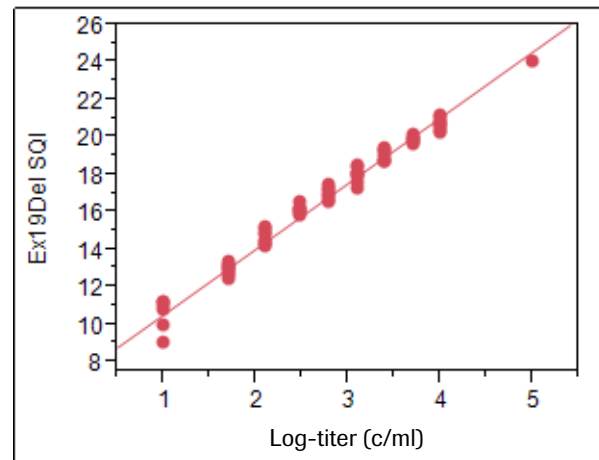
Figur 8 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
G719A cellelinje-DNA



$$\text{SQI} = -0,987 + 2,986 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,968$$

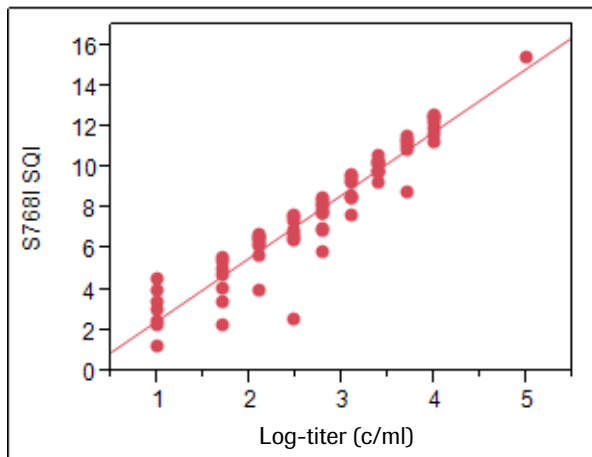
Figur 9 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
Ex19 Del cellelinje-DNA



$$\text{SQI} = 7,042 + 3,507 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,981$$

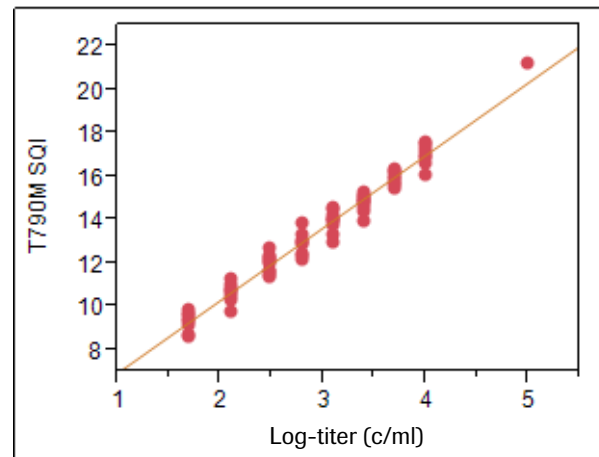
Figur 10 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
S768I cellelinje-DNA



$$\text{SQI} = -0,578 + 3,093 \times \log\text{-kopier per ml}$$

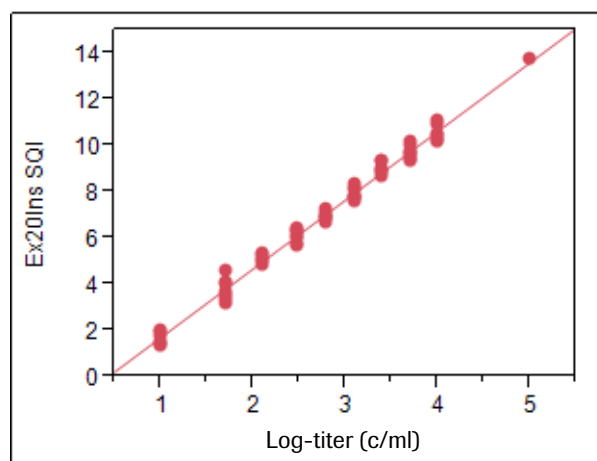
$$R^2 = 0,912$$

Figur 11 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
T790M cellelinje-DNA



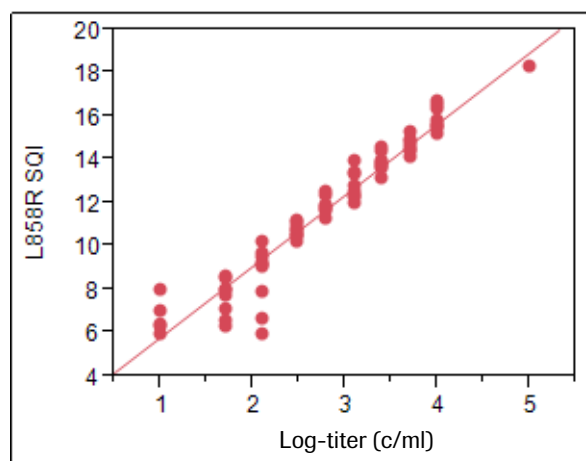
$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,973$$

Figur 12 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
Ex20Ins cellelinje-DNA

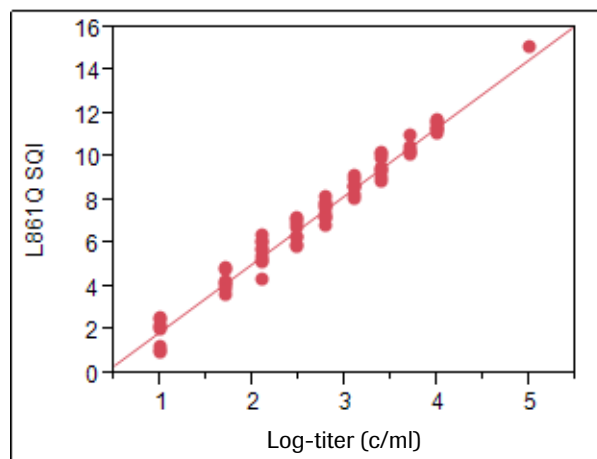
$$\text{SQI} = -1,268 + 2,973 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,990$$

Figur 13 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
L858R cellelinje-DNA

$$\text{SQI} = 2,543 + 3,283 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,933$$

Figur 14 Linearitet for mutant DNA i K2 EDTA-plasma:
L861Q cellelinje-DNA

$$\text{SQI} = -1,177 + 3,149 \times \log\text{-kopier per ml}$$

$$R^2 = 0,980$$

Roche cfDNA-plasma

Linearitetsområdet med Roche cfDNA-plasma ble verifisert ved bruk av en fortynningsserie med minst 6 panelprøver over linearitetsområdet fastslått med K2 EDTA-plasmaprøver (Tabell 26). Panelprøver ble tillaget ved å fortynne kuttet cellelinje-DNA bestående av dominerende mutasjoner i friskt Roche cfDNA-donorplasma som er villtype for EGFR. Evalueringen ble utført i samsvar med CLSI-retningslinjen EP06-A.²⁴ Fire replikater per panelprøve for 2 forskjellige loter ble testet for konsentrasjoner opptil 1,0E+04 kopier/ml (totalt 8 replikater per nivå). Over 1,0E+04 kopier/ml ble 2 replikater testet per lot (totalt 4 replikater per nivå).

Repeterbarhet

Repeterbarheten for **cobas** EGFR-testen ble vurdert ved å bruke et panel med tolv prøver bestående av fortynninger av EGFR-mutant cellelinje-DNA i friske K2 EDTA-donorplasmaprøver. Den dominerende mutasjonen for hver klasse som rapporteres med testen, ble kofortynnet i elleve prøver og vurdert ved $3 \times \text{LoD}$ for hver mutasjon (i kopier/ml), $1,0\text{E}+03$ kopier/ml og $5,0\text{E}+04$ kopier/ml. I tillegg ble én villtypeprøve testet. Hver av de tolv prøvene ble testet i duplikat av to operatører ved bruk av to ulike reagensloter og to **cobas**® z 480-analysatorer over 4 dager (N = 32 per prøve). **cobas** EGFR-testen hadde en korrekt mutasjonstyperate på 99,2 % (381/384).

Tabell 27 viser en liste over gjennomsnittlig SQI og SQI SD fra repeterbarhetsstudien. Alle 32 replikater for villtypeprøven ga det forventede resultatet “No Mutation Detected”.

Tabell 27 Gjennomsnittlig SQI og SQI SD fra repeterbarhetsstudien

EGFR-ekson	EGFR-mutasjon	Målnukleinsyresekvens	Konsentrasjon (kopier/ml)	Gjennomsnittlig 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-villtype			0	NMD	NMD

NMD = No Mutation Detected

Evaluering av klinisk ytelse

Klinisk reproduserbarhet med K2 EDTA-plasma

Det ble utført en studie for å vurdere reproduserbarheten til **cobas** EGFR-testen over 3 teststeder (2 eksterne og 1 internt, 2 operatører per sted), ved bruk av 3 reagensloter og over 3 ikke-etterfølgende testdager, med et panel bestående av ni konstruerte prøver bestående av cellelinje-DNA fortynnet i NSCLC-plasma. Mutasjoner som inkluderte én G719X-mutasjon i ekson 18, én delesjonsmutasjon i ekson 19, to T790M-mutasjoner i ekson 20, én innskuddsmutasjon i ekson 20, én L858R-mutasjon i ekson 21 og én L861Q-mutasjon i ekson 21, var representert i fire konstruerte prøver, som oppsummert i Tabell 28. Hver konstruert prøve ble klargjort på to nivåer: ca. 100 kopier/ml og 300 kopier/ml. Disse konstruerte prøvene ble satt sammen til åtte separate panelprøver, som sammen med en villtypekontroll utgjorde panelet med ni prøver.

Tabell 28 Mutasjonskombinasjoner fra konstruerte prøver

Cellelinje-DNA-kombinasjon 1	Cellelinje-DNA-kombinasjon 2	Cellelinje-DNA-kombinasjon 3	Cellelinje-DNA-kombinasjon 4
Exon 19 Del	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Exon 20 Ins

Totalt 37 analyseserier ble utført med 36 gyldige analyseserier og én ugyldig analyseserie. Til sammen 648 paneler (eller 1224 mutasjoner) ble testet, hvorav 646 paneler (eller 1220 mutasjoner) hadde gyldige resultater. Det var ingen "Mutation Detected"-resultater i 72 gyldige tester av villtypepanelprøven, noe som ga 100 % samsvar. Samsvar varierer for mutasjonspanelprøvene: åtte oppnådde 100 % samsvar, fem > 97 %, og én mutasjon (G719X) viste et lavere samsvar på omtrent 90 %. Resultatene for det samlede samsvaret per mutasjon vises i Tabell 29. Variasjonskoeffisienten (CV) var $\leq 12,8\%$ i alle mutantpanelprøvene. For den interne kontrollen og mutantkontrollen var samlet variasjonskoeffisient (CV) $\leq 1,5\%$. Variasjonskoeffisienten (CV) var $\leq 0,89\%$ mellom loter og $\leq 1,47\%$ innen lot.

Tabell 29 Estimert samlet samsvar per mutasjonspanelprøve i reproducerbarhetsstudien

Mutasjonspanelprøve	Antall gyldige tester	Samsvar N	Samsvar % (95 % KI) ^a
Villtype – NA	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 18 G719A – 100 kopier/ml	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
Ekson 19-delesjon (2235_2249del15) – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20-innskudd (2307_2308ins9) – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 S768I – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 T790M – 100 kopier/ml	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
Ekson 21 L858R – 100 kopier/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Ekson 21 L861Q – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 18 G719A – 300 kopier/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Ekson 19-delesjon (2235_2249del15) – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20-innskudd (2307_2308ins9) – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 S768I – 300 kopier/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekson 20 T790M – 300 kopier/ml	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
Ekson 21 L858R – 300 kopier/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekson 21 L861Q – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)

^a 95 % KI = 95 % eksakt binomialt konfidensintervall.

^b Lavere samsvar for denne prøven skyldes primært multiple mistede mutasjonspåvisninger (n = 6/24 kombinerte replikater) som primært forekom på ett av tre steder.

Merk: Resultater var i samsvar når en mutanttypepanelprøve hadde et gyldig “Mutation Detected”-resultat eller når en villtypepanelprøve hadde et gyldig “No Mutation Detected”-resultat.

Merk: Prøvene i denne studien besto av cellelinje-DNA som var mekanisk kuttet til en gjennomsnittsstørrelse på 220 bp og hadde en villtype-DNA-bakgrunn på ca. 12 000 kopier/ml.

Klinisk reproducerbarhet med Roche cfDNA-plasma

Det ble utført en studie for å vurdere reproducerbarheten til **cobas** EGFR-testen over 3 teststeder (2 eksterne og 1 internt, 2 operatører per sted), ved bruk av én reagenslot og over 3 ikke-etterfølgende testdager, med tre paneler bestående av ni konstruerte prøver bestående av cellelinje-DNA fortynnet i tre unike friske donorplasma-pooler. Prøvene i hver pool ble tatt i en unik lot Roche cfDNA-rør. To av plasmapanelene ble testet ved hvert sted. Mutasjoner som inkluderte én G719X-mutasjon i ekson 18, én delesjonsmutasjon i ekson 19, én T790M-mutasjon i ekson 20, én innskuddsmutasjon i ekson 20, én L858R-mutasjon i ekson 21 og én L861Q-mutasjon i ekson 21, var representert i fire konstruerte prøver, som oppsummert i Tabell 30. Hver konstruert prøve ble klargjort på to nivåer: ca. 100 kopier/ml og 300 kopier/ml. Disse konstruerte prøvene ble satt sammen til åtte separate panelprøver, som sammen med en villtypekontroll utgjorde panelet med ni prøver.

Tabell 30 Mutasjonskombinasjoner fra konstruerte prøver

Cellelinje-DNA-kombinasjon 1	Cellelinje-DNA-kombinasjon 2	Cellelinje-DNA-kombinasjon 3	Cellelinje-DNA-kombinasjon 4
Exon 19 Del	S768I	T790M	L858R
Exon 20 Ins	G719A	L861Q	n/a

Totalt ble det utført 36 analyseserier, og alle var gyldige. Til sammen 648 paneler ble testet, hvorav 646 paneler (eller 1220 mutasjoner) hadde gyldige resultater. Det var ett "Mutation Detected"-resultat i 72 gyldige tester av villtypepanel-prøven, noe som ga 98,6 % samsvar. Samsvar varierer for mutasjonsprøvene: 13 oppnådde 100 % samsvar, og én oppnådde > 98 %. Resultatene for det samlede samsvaret per mutasjon vises i Tabell 31. Variasjonskoeffisienten (CV) var $\leq 13,7\%$ i alle mutantpanelprøvene. For den interne kontrollen og mutantkontrollen var samlet variasjonskoeffisient (CV) $\leq 1,3\%$.

Tabell 31 Estimert samlet samsvar per mutasjonspanelprøve i reproduktibilitetsstudien

Mutasjonspanelprøve	Antall gyldige tester	Samsvar N	Samsvar % (95 % KI) ^a
Villtype – NA	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekson 18 G719A – 100 kopier/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Ekson 19-delesjon (2235_2249del15) – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20-innskudd (2307_2308ins9) – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 S768I – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 T790M – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 21 L858R – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 21 L861Q – 100 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 18 G719A – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 19-delesjon (2235_2249del15) – 300 kopier/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekson 20-innskudd (2307_2308ins9) – 300 kopier/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekson 20 S768I – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 20 T790M – 300 kopier/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ekson 21 L858R – 300 kopier/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ekson 21 L861Q – 300 kopier/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a 95 % KI = 95 % eksakt binomialt konfidensintervall.

Merk: Resultater var i samsvar når en mutanttypepanelprøve hadde et gyldig "Mutation Detected"-resultat eller når en villtypepanelprøve hadde et gyldig "No Mutation Detected"-resultat.

Deteksjonsgrense (LoD) ved bruk av NSCLC-plasmaprøver

Det ble utført en studie for å bekrefte LoD med NSCLC K2 EDTA-plasmaprøver for tre ekson 19-delesjoner, én L858R-mutasjon og én T790M-mutasjon ved bruk av cobas EGFR-testen på tre teststeder (to eksterne og et internt, to operatører per sted), tre reagensloter og over to ikke-etterfølgende testdager, med et panel bestående av 11 NSCLC-plasmaprøver (fem mutasjoner hver på to nivåer: 1×LoD og 2×LoD; pluss villtype). Totalt 12 analyseserier ble utført (to replikater per analyseserie), og alle analyseserier var gyldige. Til sammen 264 tester ble utført på de 11 panelprøvene, hvorav 262 (99,2 %) tester var gyldige. "Mutation Detected"-resultater ble ikke observert i 23 gyldige tester av villtypepanelprøven, noe som ga 100 % samsvar. Det prosentvise samsvaret for ekson 20 T790M – 1×LoD er 95,8 %; og 100 % for alle andre mutantpanelprøver. Anslått samsvar per panelprøve er oppsummert i Tabell 32. Variasjonskoeffisienten (CV) var < 7,0 % i alle mutantpanelprøvene.

Tabell 32 Estimert samsvar per panelprøve

Panelprøve	Antall gyldige tester	Samsvar N	Samsvar % (95 % KI) ^a
Villtype – NA	23	23	100 (85,2, 100,0)
Ekson 19-delesjon 1 – 1×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 19-delesjon 1 – 2×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 19-delesjon 2 – 1×LoD	23	23	100 (85,2, 100,0)
Ekson 19-delesjon 2 – 2×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 19-delesjon 3 – 1×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 19-delesjon 3 – 2×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 20 T790M – 1×LoD	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
Ekson 20 T790M – 2×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 21 L858R – 1×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Ekson 21 L858R – 2×LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a 95 % KI = 95 % eksakt binomialt konfidensintervall.

Merk: Resultater er i samsvar når en gyldig test av en mutanttypepanelprøve har et “Mutation Detected”-resultat eller når en gyldig test av en villtypepanelprøve har et “No Mutation Detected”-resultat.

Merk: Kliniske prøver i denne studien hadde en villtype-DNA-bakgrunn på ca. 24 000 kopier/ml.

Korrelasjon mellom Roche cfDNA-plasma og K2 EDTA-plasma

Ytelsen til **cobas** EGFR-testen med K2 EDTA-plasma og Roche cfDNA-plasma ble sammenlignet ved å teste et prøvepanel som inkluderte parvise prøver fra 34 EGFR villtype NSCLC-pasienter, 17 EGFR-mutasjonspositive NSCLC-pasienter og 20 friske donorer. Prøvene fra friske donorer ble brukt til å konstruere prøver som besto av kuttet cellelinje-DNA bestående av dominerende mutasjoner rapportert av **cobas** EGFR-testen tilsatt i fullblod tatt i K2 EDTA- og Roche cfDNA-rør. Nivået for tilsetning av kuttet cellelinje-DNA i de konstruerte prøvene var ca. 1,5×LoD for hver mutasjon som ble fastslått med K2 EDTA-plasma (Tabell 24). Mutasjonsstatusen ble bekreftet for hver NSCLC-pasient ved bruk av en NGS-metode. Hver prøve ble testet med én lot **cobas** EGFR-testreagenser. Alle prøver ga gyldige resultater, og resultatene av sammenligningen er vist i Tabell 33.

Tabell 33 Samsvarsanalyse mellom K2 EDTA-plasma og plasma fra Roche cfDNA-røret

		K2 EDTA-rør		Totalt
		MD	NMD	
Roche Cell-Free DNA Tube	MD	37	0	37
	NMD	0	34	34
	Totalt	37	34	71

Positivt samsvar (%):	100 %
95 % KI	90,5 % – 100 %
Negativt samsvar (%):	100 %
95 % KI	89,7 % – 100 %
Samlet samsvar (%):	100 %
95 % KI	94,5 % – 100 %

Der: MD = Mutation Detected, NMD = No Mutation Detected

Samsvar mellom parvise prøver for K2 EDTA-plasma og plasma fra Roche Cell-Free DNA Collection Tubes var 100 %. Ingen avvikende resultater ble observert.

I plasmaprøver fra studien detekterte **cobas** EGFR-testen følgende mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21 i EGFR-genet, som oppført i Tabell 34. Med mindre annet er angitt ble mutasjonene observert i NSCLC-prøvene.

Tabell 34 Mutasjoner observert i samsvar mellom Roche cfDNA-plasma og K2 EDTA-plasma

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	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	Ikke funnet
	2237_2251del15 [§]	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC [§]	L747P	24267
	2251A>C [§]	T751P	Ikke funnet
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Kun observert i konstruert prøve

⁺ Observert i konstruert prøve og NSCLC-prøve

[§] Kun observert i NSCLC-prøve

Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase III-plasmaprøver fra ASPIRATION-kohorten

Den analytiske nøyaktigheten til **cobas** EGFR-testen ved deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjoner ble vurdert ved å sammenligne den med en validert neste generasjons sekvenseringsplattform (NGS) ved bruk av K2 EDTA-plasmaprøver fra pasienter med fremskreden NSCLC fra én eller flere av de følgende studiene (ASPIRATION-kohort): De kliniske Genentech-studiene G027821 (MetMab) og G027761 (MetLung) sammen med den kliniske Roche-studien ML25637 (ASPIRATION).

Ett hundre og tjueåtte plasmaprøver med et volum på 2 ml og med gyldige parede resultater fra både **cobas** EGFR-testen i plasma og en NGS-metode som brukte plasmaprøver, ble inkludert i samsvarsanalysen for EGFR ekson 19-delesjonen eller L858R-mutasjonene. Til sammen 32 prøver hadde resultatet MD, og 95 hadde resultatet NMD med NGS-metoden. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) mellom **cobas** EGFR-testen i plasma og NGS i plasma var 87,5 % (95 % KI: 71,9 %, 95,0 %). Det negative samsvaret (NPA) mellom **cobas** EGFR-testen og NGS var 96,8 % (95 % KI: 91,1 %, 98,9 %), som vist i Tabell 35.

Tabell 35 Sammenligning av cobas EGFR-testen i plasma med NGS for deteksjon av EGFR ekson 19-delesjon eller L858R-mutasjoner

Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Positivt prosentvis samsvar (PPA)	87,5 % (28/32)	71,9 %, 95,0 %
Negativt prosentvis samsvar (NPA)	96,8 % (92/95)	91,1 %, 98,9 %

Korrelasjon mellom plasma- og vevsprøver med cobas EGFR-testen for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjoner ved bruk av fase III-prøver fra ENSURE

ENSURE-studien (YO25121) var en flersenters, åpen, randomisert fase III-studie, som evaluerte effekten og sikkerheten med TARCEVA® (erlotinib) sammenlignet med gemcitabin/cisplatin som førstelinjehandling hos pasienter med ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) i stadium IIIB/IV, med tumorer som hadde delesjonsmutasjoner i ekson 19 eller L858R-mutasjoner i tyrosin-kinase-domenet av epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). Til sammen 647 pasienter ble screenet. 601 pasienter fikk et gyldig vevs-EGFR-resultat for delesjon i ekson 19 og L858R-mutasjon med **cobas** EGFR-testen, og 217 pasienter ble randomisert i studien.

Fem hundre og sytten pasienter (86,0 %, 517/601) hadde samsvarende K2 EDTA-plasmaprøver og vevsprøver, og 441 pasienter hadde et plasmaprøvevolum på $\geq 2,0$ ml, dvs. det prøvevolumet som **cobas** EGFR-testen i plasma er validert for.

Korrelasjonen mellom plasma- og vevsprøver med **cobas** EGFR-testen for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjon ble evaluert både hver for seg og samlet. Til sammen 431 prøver med parede gyldige resultater fra både vevs- og plasmaprøver med **cobas** EGFR-testen ble inkludert i samsvarsanalysen. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) mellom plasma- og vevsprøver var 76,7 % (95 % KI: 70,5 % til 81,9 %) og det negative prosentvise samsvaret (NPA) var 98,2 % (95 % KI: 95,4 % til 99,3 %) for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjon samlet, som vist i Tabell 36. Det positive prosentvise samsvaret (PPA), det negative prosentvise samsvaret (NPA) og det samlede prosentvise samsvaret (OPA) for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjon hver for seg, vises også i Tabell 36.

Tabell 36 Samsvar mellom plasmaprøver og vevsprøver ved deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjoner med cobas EGFR-testen

Mutasjon	Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Samlet	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	76,7 % (161/210)	70,5 %, 81,9 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	98,2 % (217/221)	95,4 %, 99,3 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	87,7 % (378/431)	84,2 %, 90,5 %
Ekson 19-delesjon	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	80,8 % (97/120)	72,9 %, 86,9 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	98,7 % (307/311)	96,7 %, 99,5 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	93,7 % (404/431)	91,0 %, 95,7 %
L858R	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	67,8 % (61/90)	57,6 %, 76,5 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	99,1 % (338/341)	97,4 %, 99,7 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	92,6 % (399/431)	89,7 %, 94,7 %

Merk: PPA og NPA ble beregnet ved bruk av vev som referanse.

Positiv prediktiv verdi (PPV) og negativ prediktiv verdi (NPV) for deteksjon av ekson 19-delesjon og L858R-mutasjoner samlet ble også beregnet ved bruk av bootstrap-metoden basert på prevalensen i vev i ulike populasjoner (Tabell 37). Som forventet vil PPV øke og NPV synke når EGFR-mutasjonsprevalensen øker. For en kaukasisk pasientpopulasjon, som har en antatt EGFR-mutasjonsprevalens på 10–15 % i vev, varierer PPV fra 82,8 % til 88,6 % mens NPV varierer fra 96,0 % til 97,4 %. PPV varierer fra 94,8 % til 97,8 % mens NPV varierer fra 80,8 % til 90,9 % hvis de baseres på prevalensen i en asiatisk populasjon, som har en antatt EGFR-mutasjonsprevalens på 30–50 % i vev.

Tabell 37 Estimerte prediktive verdier med cobas EGFR-testen i vev og cobas EGFR-testen i plasma (pasienter med plasmaprøvevolumer på $\geq 2,0$ ml) basert på varierende EGFR-mutasjonsprevalens i vev

Antatt EGFR-prevalens basert på vevsprøver	Positiv prediktiv verdi (PPV)	Negativ prediktiv verdi (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 %)

Merk: 95 % KI-verdiene ble beregnet ved bruk av bootstrap-metoden.

Merk: Resultatet av 79 prøver med et volum på $< 2,0$ ml ble behandlet som ugyldig i denne analysen.

Merk: PPV og NPV ble beregnet ved bruk av plasma som referanse.

Korrelasjon til referansem metode ved bruk av fase II-prøver fra AURA2

Den kliniske ytelsen til cobas EGFR-testen ble vurdert ved å sammenligne den med en validert nestegenerasjons sekvenseringsplattform (NGS) ved bruk av K2 EDTA-plasmaprøver fra pasienter med fremskreden NSCLC som ble screenet i fase II i AURA2-studien av TAGRISSO®.²³

Av de 383 kvalifiserte pasientene hadde 344 pasienter en plasmaprøve tilgjengelig som ble testet med cobas EGFR-testen. Dette ga 342 gyldige resultater og to ugyldige resultater. Av totalt 344 plasmaprøver som ble testet med cobas EGFR-testen, ble 322 (93,6 %) også testet med en NGS-metode. 22 hadde ikke nok plasmavolum igjen til å bli testet med NGS.

Den analytiske nøyaktigheten til cobas EGFR-testen sammenlignet med referansemetoden, NGS, for deteksjon av T790M-mutasjonen i plasmaprøver ble evaluert. Til sammen 320 prøver med gyldige parede resultater fra både cobas EGFR-testen og NGS ble inkludert i samsvarsanalysen. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) mellom cobas EGFR-testen og NGS var 91,5 % (95 % KI: 85,7 % til 95,1 %) og det negative prosentvise samsvaret (NPA) var 91,1 % (95 % KI: 86,0 % til 94,4 %) for deteksjon av T790M-mutasjonen, som vist i Tabell 38.

Tabell 38 Sammenligning av cobas EGFR-testen i plasma med NGS for deteksjon av EGFR T790M-mutasjonen

Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
Positivt prosentvis samsvar (PPA)	91,5 % (129/141)	85,7 %, 95,1 %
Negativt prosentvis samsvar (NPA)	91,1 % (163/179)	86,0 %, 94,4 %

I K2 EDTA-plasmaprøver fra AURA2-studien detekterte cobas EGFR-testen mutasjoner i ekson 18, 19, 20 og 21 i EGFR-genet, som oppført i Tabell 39.

Tabell 39 Mutasjoner detektert i AURA2-kohorten med cobas EGFR-testen

Ekson	Mutasjonssekvens	Aminosyreendring	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	Ikke funnet
	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	Ikke funnet
	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	Ikke funnet
	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

Korrelasjon mellom plasma- og vevsprøver for deteksjon av T790M ved bruk av fase II-prøver fra AURA2

Den kliniske AURA2-studien²³ var en flersenters, åpen, enkeltarmstudie i fase II, som undersøkte sikkerheten og effekten av TAGRISSO® (osimertinib) som andre- eller ≥ tredjelinjebehandling hos pasienter med fremskreden NSCLC, som hadde progrediert etter tidligere behandling med et godkjent EGFR TKI-middel og som var påvist T790M-positive med **cobas** EGFR-testen. Til sammen 472 pasienter ble screenet. 383 fikk en vevsprøve testet, og 371 pasienter fikk et gyldig vevs-EGFR-resultat for T790M-mutasjonen med **cobas** EGFR-testen, hvorav 233 pasienter var T790M-positive, og 210 pasienter ble randomisert i studien.

Av de 383 kvalifiserte pasientene hadde 344 pasienter K2 EDTA-plasmaprøver. Til sammen 334 prøver med parede gyldige resultater fra både vevs- og plasmaprøver med **cobas** EGFR-testen ble inkludert i analysen. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) mellom plasma- og vevsprøver var 58,7 % (95 % KI: 52,2 %, 65,0 %) og det negative prosentvise samsvaret (NPA) var 80,2 % (95 % KI: 71,8 %, 86,5 %) for deteksjon av T790M-mutasjonen. Den positive

prediktive verdien (PPV) var 85,6 % (95 % KI: 79,2 %, 90,3 %) og den negative prediktive verdien (NPV) var 49,2 % (95 % KI: 42,0 %, 56,4 %) for deteksjon av T790M-mutasjonen, som vist i Tabell 40.

Den positive prediktive verdien (PPV) i Tabell 40 ble påvirket av de 22 prøvene som var T790M-negative med **cobas** EGFR-testen i vev og T790M-positive med **cobas** EGFR-testen i plasma. Atten prøver ble bekreftet som T790M-positive med NGS i plasma, og én prøve hadde ikke nok volum til NGS-testing. Bare tre ble påvist å være T790M-negative med NGS.

Tabell 40 Samsvar mellom plasmaprøver og vevsprøver ved deteksjon av T790M-mutasjonen med cobas EGFR-testen

Mutasjon	Mål for samsvar	Prosentvis samsvar (N)	95 % KI
T790M	Positivt prosentvis samsvar (PPA)	58,7 % (131/223)	52,2 %, 65,0 %
	Negativt prosentvis samsvar (NPA)	80,2 % (89/111)	71,8 %, 86,5 %
	Samlet prosentvis samsvar (OPA)	65,9 % (220/334)	60,6 %, 70,8 %
	Positiv prediktiv verdi (PPV)	85,6 % (131/153)	79,2 %, 90,3 %
	Negativ prediktiv verdi (NPV)	49,2 % (89/181)	42,0 %, 56,4 %

Merk: PPA og NPA ble beregnet ved bruk av vev som referanse.

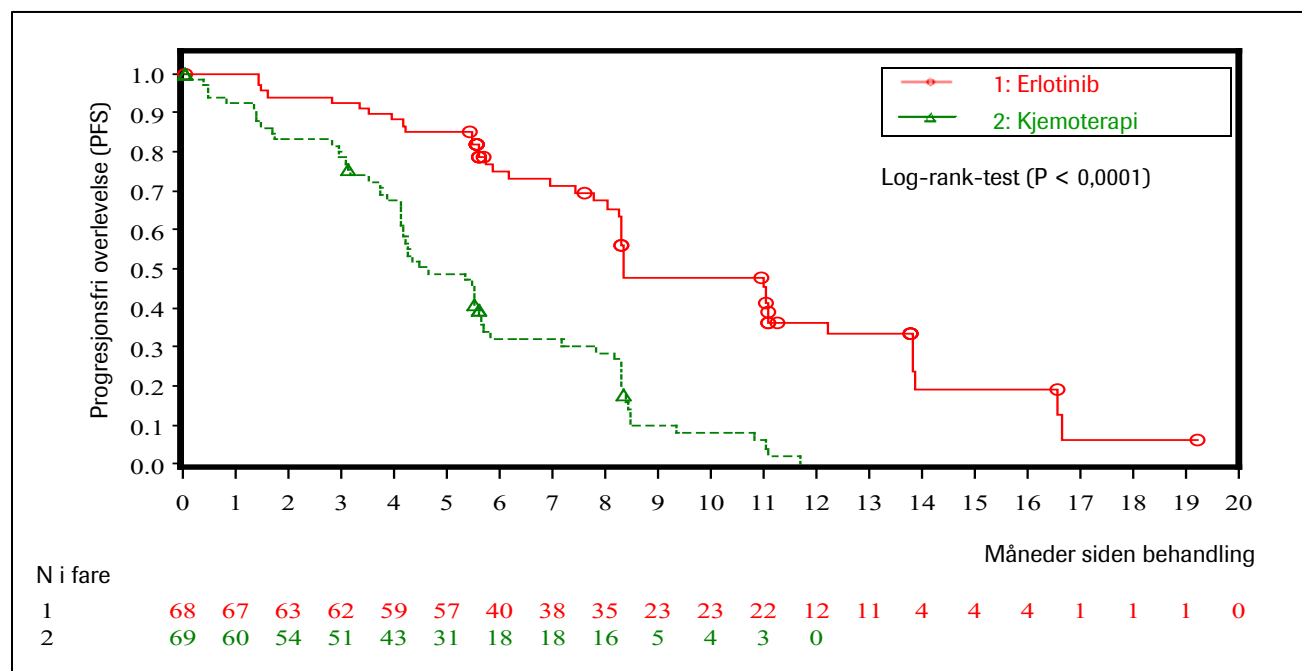
Merk: PPV og NPV ble beregnet ved bruk av plasma som referanse.

Samsvaret mellom plasma- og vevsprøver ved deteksjon av T790M-resistensmutasjonen er lavere enn for aktiverende mutasjoner. Det positive prosentvise samsvaret (PPA) kan påvirkes av vevsheterogenitet: I motsetning til de aktiverende mutasjonene L858R og ekson 19-delesjonene, er det en mulighet for at T790M er til stede i en liten prosent av tumorceller, ettersom den vanligvis er en ervervet mutasjon. Derfor er det en mulighet for at T790M cfDNA bare er til stede i svært lave konsentrasjoner i plasma og under deteksjonsnivået. Det negative prosentvise samsvaret (NPA) kan også påvirkes av tumorheterogenitet: Fordi T790M-mutasjonen ikke nødvendigvis er til stede i alle tumorceller, er det en mulighet for at det tas en vevsbiopsi fra en tumor der T790M-mutasjonen ikke er til stede, mens andre tumorsteder kan være T790M-positive.⁷

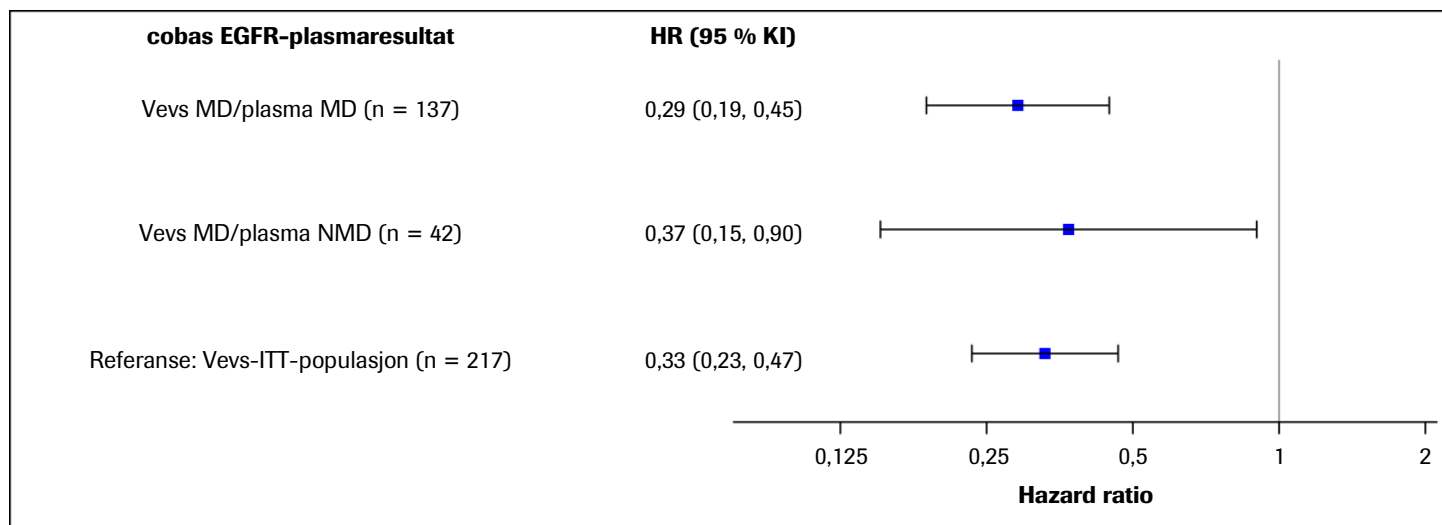
Kliniske resultater

ENSURE

Av de 217 pasientene som var innrullert i ENSURE-studien (dvs. de med en ekson 19-delesjon eller L858R-mutasjon detektert i en vevsprøve med **cobas** EGFR-testen v1), hadde 214 (98,6 %) en K2 EDTA-plasmaprøve tilgjengelig, og 180 pasienter hadde et plasmaprøvevolum på 2,0 ml. Av de 180 plasmaprøvene med et volum på 2 ml, som ble testet med **cobas** EGFR-testen, hadde 137 pasienter resultatet "Mutation Detected" for en ekson 19-delesjon eller en L858R-mutasjon (68 pasienter i erlotinib-gruppen, 69 pasienter i kjemoterapigruppen), 42 hadde resultatet "No Mutation Detected" (22 pasienter i TARCEVA®-gruppen, 20 pasienter i kjemoterapigruppen), og én prøve genererte et ugyldig resultat. Kaplan-Meier-kurvene for utprøvervurdert progresjonsfri overlevelse (PFS) vises i Figur 15 for pasienter med enten en ekson 19-delesjon eller en L858R-mutasjon i en plasmaprøve. Pasientene i TARCEVA®-gruppen hadde en lengre progresjonsfri overlevelse (PFS) sammenlignet med pasienter i kjemoterapigruppen, og de to kurvene var godt adskilt under observasjonsperioden (p-verdi < 0,001). Dette viste betydelig nytte av behandlingen med TARCEVA® hos pasienter med en detekterbar EGFR-aktiverende mutasjon i plasma.

Figur 15 Kaplan-Meier-plott av progresjonsfri overlevelse (PFS) per behandling for pasienter med mutasjon detektert med cobas EGFR-testen i både plasma og vev (utprøvers vurdering) (med 2 ml plasmaprøver)

En konsistent PFS-gevinst ble observert for alle pasienter som var vevs-EGFR-mutasjonspositive med plasmaprøvevolumer på 2,0 ml, uansett om de var plasmamutasjonspositive eller -negative, og denne gevinsten var samsvarende med PFS-gevinsten som ble observert i den samlede ENSURE ITT-populasjonen (HR = 0,33; 95 % KI: 0,23, 0,47), som vist i Figur 16 nedenfor.

Figur 16 Forest-plott for HR for progresjonsfri overlevelse (PFS) ved utprøvers vurdering (med 2 ml plasmaprøver)

Merk: MD = Mutation Detected (ekson 19-delesjon eller L858R); NMD = No Mutation Detected (ekson 19-delesjon og L858R)

AURA2

Den primære endepunktvariabelen for effekt var objektiv responsrate (ORR) i henhold til RECIST 1.1, med BICR, basert på analysesettet for responsevaluering. ORR var definert som antall (%) pasienter med minst ett besøk og et resultat av komplett respons (CR) eller delvis respons (PR) som ble bekreftet minst fire uker senere (dvs. den beste objektive responsen [BOR] av CR eller PR).

I vevs-ERAS (Evaluable Response Analysis Set)-populasjonen (T790M-positive pasienter med **cobas** EGFR-testen i vev som fikk minst én dose med TAGRISSO® og hadde målbar sykdom ved baseline i henhold til BICR), var 111 pasienter K2 EDTA-plasma-T790M-positive med **cobas** EGFR-testen (dvs. T790M-positive med både vevs- og plasmaprøver). Den objektive responsraten (ORR) for denne undergruppen var 64,9 % (72/111, 95 % KI: 52,1 %, 70,4 %), som er svært likt den observerte objektive responsraten (ORR) på 64,1 % hos vevs-ERAS-populasjonen.

I vevs-FAS (Full Analysis Set)-populasjonen (T790M-positive-pasienter med **cobas** EGFR-testen i vev som fikk minst én dose med TAGRISSO®), var 117 pasienter plasma-T790M-positive med **cobas** EGFR-testen. Den objektive responsraten (ORR) for pasienter med et T790M-positivt resultat fra både vevs- og plasmaprøver var 61,5 % (72/117, 95 % KI: 55,2 %, 73,7 %), som også er svært likt den observerte objektive responsraten (ORR) på 61 % hos vevs-FAS-populasjonen. Resultatene av disse analysene er presentert i Tabell 41. Ettersom innrulling i AURA2 var basert på positive testresultater fra vev, er resultater for (T790M-plasmapositive, T790M-vevsnegative) pasienter ikke tilgjengelige for denne studien.

Tabell 41 Objektiv responsrate etter plasmapresultat blant innrullerte pasienter (T790M-positive fra vev) fra AURA2-studien

Populasjon (T790M-positive fra vevsprøve)	Resultater med cobas EGFR-test fra plasmaprøve	N	Antall pasienter med respons (ORR) ^a n (%)	ORR (95 % KI)
Komplett analysesett for vev (vevs-FAS)	T790M-positive (plasma-FAS)	117	72 (61,5 %)	(55,2 %, 73,7 %)
	T790M-negative	89	53 (59,6 %)	(51,3 %, 73,0 %)
	Samlet (vevs-FAS)	210	128 (61,0 %)	(57,0 %, 70,8 %)
Analysesett for responsevaluering for vev (vevs-ERAS)	T790M-positive (plasma-ERAS)	111	72 (64,9 %)	(52,1 %, 70,4 %)
	T790M-negative	83	52 (62,7 %)	(48,6 %, 69,8 %)
	Samlet (vevs-ERAS)	198	127 (64,1 %)	(54,0 %, 67,6 %)

^a Responser omfatter bare bekreftede responser.

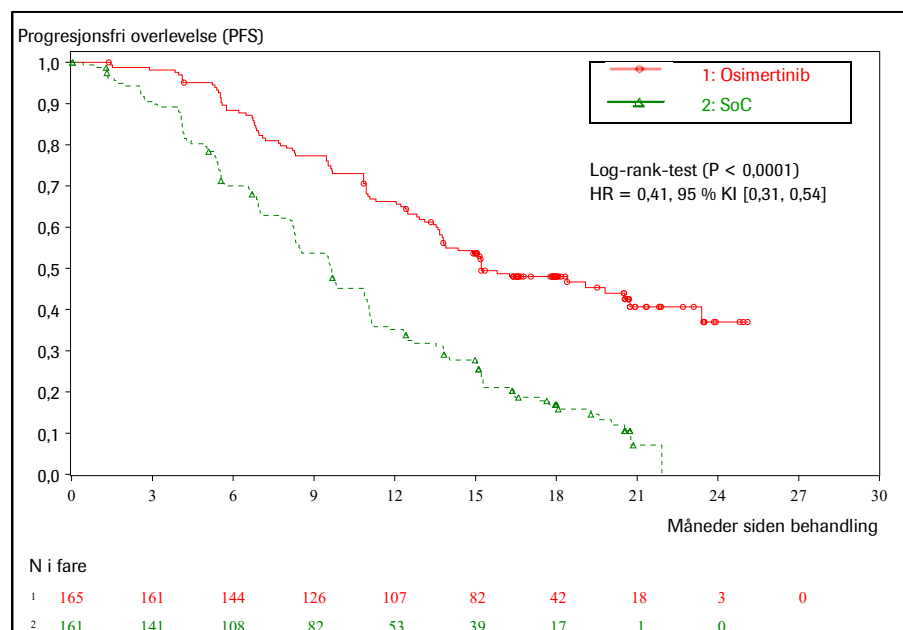
FLAURA

I. Fase III-studie for TAGRISSO® førstelinje

Til sammen 994 pasienter ble screenet for FLAURA-studien¹⁰ 556 pasienter ble randomisert til den kliniske studien, og 438 besto ikke screeningen. Av de 556 FLAURA-randomiserte pasientene var 537 kvalifisert for analysering i studien. Av de 537 studiekvalifiserte pasientene ble 276 randomisert med en sentral **cobas** EGFR-vevstest, og av disse hadde 254 en K2 EDTA-plasmaprøve tilgjengelig for testing, med 190 positive for **cobas** EGFR-plasmatesten (pEGFRm+). 261 ble randomisert med en lokal vevstest, og av disse hadde 242 en plasmaprøve tilgjengelig for testing, med 169 positive for **cobas** EGFR-plasmatesten (136 **cobas** EGFR-mutasjonspositive vev (tEGFRm+), 1 **cobas** EGFR-mutasjonsnegative vev (tEGFRm-) og 32 ugyldige/ikke testet med **cobas**-vevstesten).

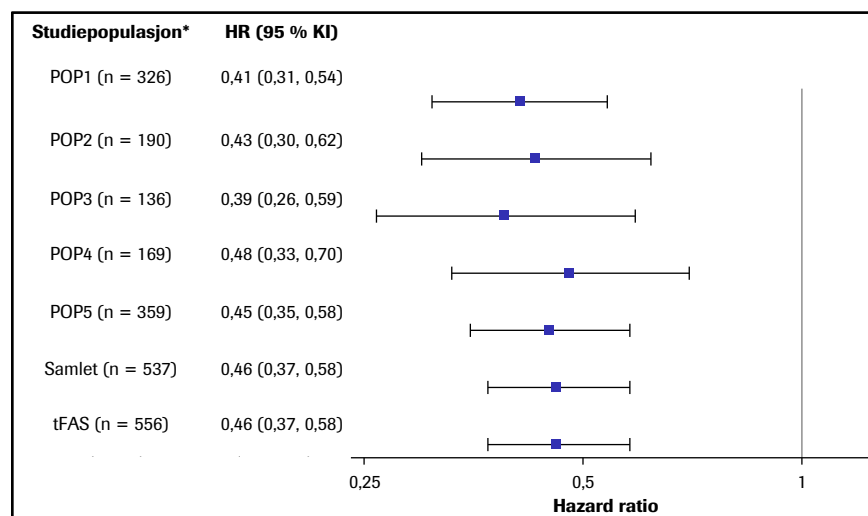
For den primære plasmapopulasjonen (tEGFRm+ og pEGFRm+) med **cobas** EGFR-testen, N = 326, 190 sentralt randomisert og 136 lokalt randomisert) var HR 0,41 (95 % KI: 0,31, 0,54), og HR for FLAURA FAS (tEGFRm+, N = 556) var 0,46 (95 % KI: 0,37, 0,58). Derfor stemmer medikamentets effekt for den primære plasmapopulasjonen overens med effekten for FLAURA FAS-populasjonen. Kaplan Meier-plottet for den primære plasmapopulasjonen med en plasmaprøve som enten viste en delesjon i ekson 19 eller en L858R-mutasjon, vises i Figur 17.

Figur 17 Kaplan-Meier-plott av progresjonsfri overlevelse (PFS) per behandling for den primære plasmapopulasjonen i FLAURA-studien (pasienter som var cobas tEGFRm+ og cobas pEGFRm+, n = 326)



TAGRISSO® viste en overlegenhet i forhold til standardbehandlingen, og dette var konsistent for alle plasmapositive undergrupper definert av lokal og sentral **cobas** tEGFR-innmeldingsstatus, med HR i området fra 0,39 til 0,48, og var konsistent med HR som ble oppnådd fra FLAURA FAS-populasjonen (HR = 0,46) som vist i Figur 18 nedenfor.

Figur 18 Forest-plott for HR for FLAURA-undergruppene definert av lokal og sentral cobas EGFR-teststatus



POP = Populasjon (undergruppe)

* POP1: Alle randomiserte pasienter med en positiv **cobas**-vevstest og **cobas**-plasmatest.

POP2: Pasienter randomisert med **cobas**-vevstesten som også var positive med **cobas**-plasmatesten.

POP3: Pasienter randomisert med en lokal vevstest som også var positive med **cobas**-vevs- og plasmatesten.

POP4: Pasienter randomisert med en lokal vevstest som også var positive med **cobas**-plasmatesten.

POP5: Alle randomiserte pasienter med en positiv **cobas**-plasmatest.

Samlet: Alle randomiserte pasienter unntatt 19 kinesiske pasienter.

tFAS: Alle randomiserte pasienter (FLAURA komplett analysesett).

II. Analyse av standardbehandling med IRESSA®

Det ble utført en separat analyse av pasienter fra gruppen som fikk standardbehandling (SoC) og ble behandlet med IRESSA® (gefitinib). Av alle IRESSA®-behandlede pasienter med en utprøvervurdert objektiv respons i FLAURA, var 105 pasienter positive med cobas-plasmatesten fra K2 EDTA-plasmaprøver. ORR for alle cobas plasmapositive pasienter var 71,4 % (75/105, 95 % KI: 62,2 %, 79,2 %, POP4 i Tabell 42).

Av de 105 pasientene som hadde positive resultater fra cobas-plasmatesten, ble 47 pasienter randomisert med cobas-vevstesten (primær effektpopulasjon for cobas-plasmatesten), og 58 pasienter ble randomisert med en lokal test. Til sammen 36 pasienter ble utprøvervurdert som responderende i den primære effektpopulasjonen for cobas-plasmatesten (n = 47), noe som resulterte i en ORR på 76,6 % (95 % KI: 62,8 %, 86,4 %, POP1 i Tabell 42).

ORR var 62,2 % (28/45, 95 % KI: 47,6 %, 74,9 %) i lokalt randomiserte pasienter som var positive med både cobas-vevstesten og cobas-plasmatesten (POP2 i Tabell 42). ORR var 69,6 % (64/92, 95 % KI: 59,5 %, 78,0 %) hos alle IRESSA®-behandlede pasienter som var positive med både cobas-vevstesten og cobas-plasmatesten (POP3 i Tabell 42). Et Forest-plott av ORR for ulike pasientpopulasjoner vises i Figur 19. Resultatene tyder på at behandlingseffekten av IRESSA®, basert på cobas-plasmatesten, ble opprettholdt i hver underpopulasjon og stemte overens med resultatene som var rapportert for den opprinnelige registreringsstudien (IFUM) for pasienter som var utvalgt for IRESSA®.¹³

Tabell 42 ORR for pasienter som ble behandlet med IRESSA® i FLAURA-studien og som var positive med cobas-plasmatesten

Objektiv respons	Plasmapositive (pEGFR+) pasienter i SoC-gruppen behandlet med IRESSA®				
	pEGFR+ sentralt randomiserte (cobas tEGFR+)	pEGFR+ lokalt randomiserte (lokal tEGFR+)			Totalt
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Ugyldig/ ikke testet	
Antall pasienter	47	45	1	12	105
Respons	36	28	1	10	75
Ikke-respons	11	17	0	2	30
ORR (% , 95 % KI)	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 %)		-	-	-

Merk: tEGFR = vevs-EGFR; pEGFR = plasma-EGFR; KI = (skår) konfidensintervall.

POP = Populasjon (undergruppe)

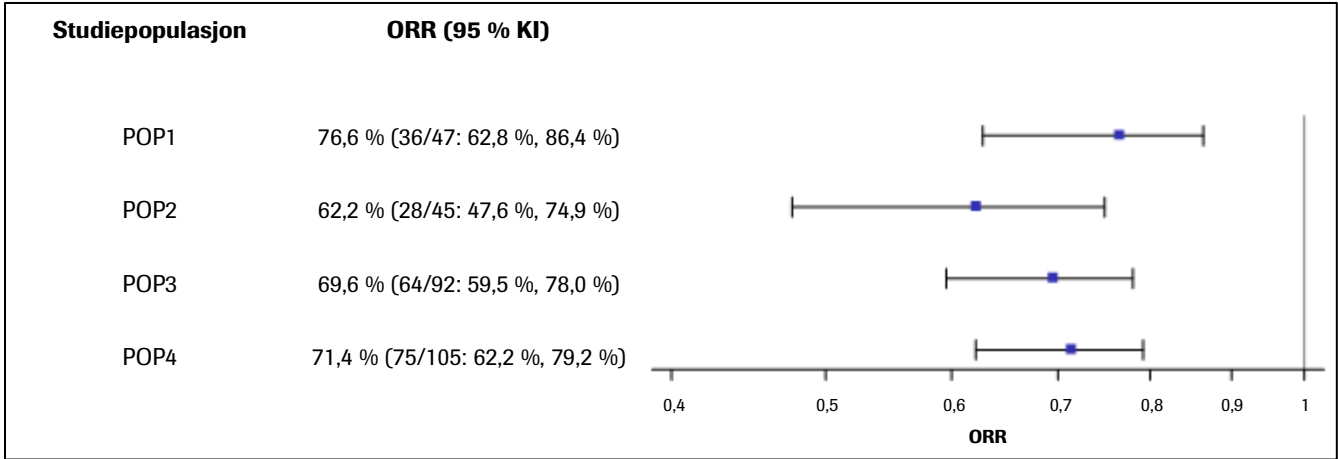
POP1: ORR for cobas pEGFR+ pasienter randomisert med cobas-vevstesten (primær effektpopulasjon for cobas-plasmatesten).

POP2: ORR for pasienter som var positive med cobas-plasma- og vevstesten, og som var randomisert med en lokal vevstest.

POP3: ORR for alle pasienter som var positive med cobas-plasma- og vevstesten.

POP4: ORR for alle pasienter som var positive med cobas-plasmatesten.

Figur 19 Forest-plott for ORR basert på cobas EGFR-testen i plasma for ulike populasjoner



POP = Populasjon (undergruppe)
POP1: ORR for **cobas** pEGFR+ pasienter randomisert med **cobas**-vevstesten (primær effektpopulasjon for **cobas**-plasmatesten).
POP2: ORR for pasienter som var positive med **cobas**-plasma- og vevstesten, og som var randomisert med en lokal vevstest.
POP3: ORR for alle pasienter som var positive med **cobas**-plasma- og vevstesten.
POP4: ORR for alle pasienter som var positive med **cobas**-plasmatesten.

Resultatflagg

Forklaring av resultatflagg

Kilden for et flagg indikeres i flaggkoden, som beskrevet i Tabell 43.

Tabell 43 Årsak til flagget

Flaggkode starter med	Årsak til flagget	Eksempel
M ^a	Flere årsaker eller andre årsaker	M6
R	Tolkning av resultater	R20
Z ^a	Analysator	Z1

^a Se operatørmanualen for **cobas®** 4800-systemet eller brukerhjelpen for **cobas®** 4800-systemet

Tabell 44 viser alle systemets resultatflagg som er relevante for brukeren.

Tabell 44 Liste over flagg tilknyttet tolkning av resultater

Flaggkode	Alvorlighets-grad	Beskrivelse	Anbefalt tiltak
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Feil	Ingen mål kunne detekteres	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det var et negativt resultat for prøven (dvs. at prøven kanskje ikke er tilsatt i en eller flere brønner).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Feil	Mutantkontrollen kunne ikke detekteres	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det oppsto en feil med algoritmen for bestemmelse av terskelverdi. Dette kan skje hvis det er et utypisk fluorescensmønster eller et fluorescensmønster med støy.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Feil	Mutantkontrollen kunne ikke detekteres	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det var et negativt resultat for mutantkontrollen. Mutantkontroll-DNA er kanskje ikke tilsatt i en eller flere brønner).
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Feil	Mutantkontrollen er utenfor akseptområdet	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at en observert Ct-verdi for mutantkontrollen var over den fastsatte terskelverdien (dvs. terskelverdi for høy). Mulige årsaker: 1. Feil preparering av Working Master Mix. 2. Pipetteringsfeil ved tilsetning av Working Master Mix i en brønn i mikrobrønnplaten. 3. Pipetteringsfeil ved tilsetning av mutantkontroll i en brønn i mikrobrønnplaten.
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Feil	Mutantkontrollen er utenfor akseptområdet	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at en observert Ct-verdi for mutantkontrollen var under den fastsatte terskelverdien (dvs. terskelverdi for lav). Denne feilen kan oppstå hvis det er DNA-kontaminering.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Feil	Negativ kontroll kunne ikke detekteres	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det oppsto en feil med algoritmen for bestemmelse av terskelverdi. Dette kan skje hvis det er et utypisk fluorescensmønster eller et fluorescensmønster med støy.

Flaggkode	Alvorlighets-grad	Beskrivelse	Anbefalt tiltak
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Feil	Den negative kontrollen er utenfor akseptområdet	Gjenta oppsettet. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det var et positivt resultat for den negative kontrollen (dvs. at det har oppstått kontaminering).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Feil	Ingen mål kunne detekteres	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det oppsto en feil med algoritmen for bestemmelse av terskelverdi. Dette kan skje hvis det er et utypisk fluorescensmønster eller et fluorescensmønster med støy.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Feil	Resultatet er utenfor akseptområdet	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det ble observert en utypisk lav Ct-verdi for prøven.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Feil	Resultatet er utenfor akseptområdet	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det ble observert et utypisk forhold mellom mutantkontrollens Ct-verdi og internkontrollens Ct-verdi for prøven.
R811, R831, R851	Feil	Internkontroll kunne ikke detekteres	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det oppsto en feil med algoritmen for bestemmelse av terskelverdi. Dette kan skje hvis det er et utypisk fluorescensmønster eller et fluorescensmønster med støy.
R812, R832, R852	Feil	Internkontroll kunne ikke detekteres	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at internkontrollresultatet for prøven var ugyldig. Fravær av et gyldig internkontrollresultat kan tyde på: 1. Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven. 2. Utilstrekkelig prøveprosessering. 3. Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven. 4. Sjeldne mutasjoner i regionene for det genomiske DNA-et som dekkes av internkontrollens primere og/eller prober. 5. Prøve-DNA er kanskje ikke tilsatt i en eller flere brønner. 6. Andre faktorer.
R813, R834, R853	Feil	Internkontroll utenfor akseptområdet	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at internkontrollresultatet for prøven var ugyldig. Fravær av et gyldig internkontrollresultat kan tyde på: 1. Genomisk DNA med dårlig kvalitet fra prøven. 2. Utilstrekkelig prøveprosessering. 3. Tilstedeværelse av PCR-hemmere i prøven. 4. Sjeldne mutasjoner i regionene for det genomiske DNA-et som dekkes av internkontrollens primere og/eller prober. 5. Prøve-DNA er kanskje ikke tilsatt i en eller flere brønner. 6. Andre faktorer.
R814, R835, R854	Feil	Internkontroll utenfor akseptområdet	Gjenta prøven. Se avsnittet Testprosedyre . Disse flaggkodene indikerer at det ble observert en utypisk lav internkontroll-Ct-verdi for prøven. Denne feilen kan oppstå hvis PCR-blandingen er overfylt med konsentrert genomisk DNA.

Tilleggsinformasjon

Symboler

Følgende symboler brukes ved merking for Roche PCR-diagnostiske produkter.

Tabell 45 Symboler brukt ved merking av Roche PCR-diagnostiske produkter

Age/DOB	Alder eller fødselsdato		Utstyr ikke for pasientnær testing	QS IU/PCR	QS IU per PCR-reaksjon, bruk QS internasjonale enheter (IU) per PCR-reaksjon ved beregning av resultatene.
	Tilleggsprogramvare		Utstyr ikke for selvtesting	SN	Serienummer
Assigned Range [copies/mL]	Angitt område (kopier/ml)		Distributør (Merk: Gjeldende land/region kan være angitt under symbolet.)	Site	Sted
Assigned Range [IU/mL]	Angitt område (IU/ml)		Skal ikke brukes om igjen	Procedure Standard	Standardprosedyre
EC REP	Autorisert representant i EU		Kvinne	STERILE EO	Sterilisert med etylenoksid
BARCODE	Strekкодedataark		Kun for evaluering av IVD-ytelse		Oppbevares på et mørkt sted
LOT	Lotnummer	GTIN	Globalt handelsnummer		Temperaturbegrensning
	Biologisk risiko		Importør		Testdefinisjonsfil
REF	Katalognummer	IVD	In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr		Denne siden opp
	CE-samsvarsmerking; dette utstyret er i samsvar med gjeldende krav til CE-merking av <i>in vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr	LLR	Nedre grense for akseptområdet	Procedure UltraSensitive	UltraSensitive-prosedyre
Collect Date	Prøvetakingsdato		Mann	UDI	Unik utstyrs-ID
	Vennligst se brukerhjelpen		Produsent	ULR	Øvre grense for akseptområdet
	Inneholder tilstrekkelig til <n> tester	CONTROL -	Negativ kontroll	Urine Fill Line	Fyllestrek for urin
CONTENT	Innhold i kitet		Ikke-steril	Rx Only	Kun USA: Føderal lov begrenser salg eller bestilling av dette utstyret til leger.
CONTROL	Kontroll		Pasientnavn		Utløpsdato
	Produksjonsdato		Pasientnummer		
	Utstyr for pasientnær testing		Riv av her		
	Utstyr for selvtesting	CONTROL +	Positiv kontroll		
		QS copies / PCR	QS-kopier per PCR-reaksjon, bruk QS-kopier per PCR-reaksjon ved beregning av resultater.		

Teknisk support

For teknisk support/assistanse, kontakt din lokale Roche-representant:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Produsent

Tabell 46 Produsent

Produsert i USA



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

Laget i USA

Varemerker og patenter

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.

Referanser

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.

Dokumentrevisjon

Informasjon om dokumentrevisjon	
Doc Rev. 8.0 07/2023	Avsnittet Instrumentering og programvare som kreves, men som ikke medfølger i avsnitt A og avsnitt B oppdaterte systemets programvareversjon til 2.2 og la til en merknad som henviser til produktinformasjonskortet. Oppdatert cobas® -merkenavn. Oppdatert avsnitt Varemerker og patenter , inkludert koblingen. Kontakt din lokale Roche-representant hvis du har noen spørsmål.