

cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas



cobas[®] EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

FFPET-proovide korral vaadake proovi ettevalmistamiseks komplekti **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Plasmaproovide korral vaadake proovi ettevalmistamiseks komplekti **cobas[®]** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

SISUKORD

Sihtotstarve.....	6
Testi ülevaade ja selgitus	7
Taust	7
Protseduuri põhimõtted	9
Proovi ettevalmistamine.....	9
PCR-amplifikatsioon.....	9
JAOTIS A: KASUTAMISEKS KOEPROOVIDEGA	11
Materjalid ja reaktiivid.....	11
Komplekti kuuluvad materjalid ja reaktiivid	11
Reaktiivide säilitamine ja käitlemine	12
Täiendavad vajalikud materjalid	13
Vajalikud seadmed ja tarkvara, mida kaasas ei ole.....	13
Ettevaatusabinõud ja käitlemise nõuded	13
Hoiatused ja ettevaatusabinõud.....	13
Hea laboritava	14
Saastumine	14
Terviklikkus	14
Utiliseerimine.....	15
Mahavoolamine ja puhastamine.....	15
Proovide võtmine, transportimine ja säilitamine	15
Proovide võtmine	15
Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus	15
Töödeldud proovide säilitamine ja stabiilsus	15
Testiprotseduur	16
Testi teostamine	16
Kasutusjuhised	16
Tööseeria maht.....	16
Tervikliku protsessi kontroll	16
DNA eraldamine	16
Makrodissektatsioon	17
DNA koguse määramine.....	17
Amplifikatsioon ja tuvastamine	17
Instrumendi seadistamine.....	17
Testi tellimuste seadistamine	18
Proovi DNA põhimaterjali lahjenduse arvutamine	18
Proovi lahjendamine	19

Reaktsiooni seadistamine	19
PCR-i alustamine	21
Tulemused	22
Tulemuste tõlgendamine	22
Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine.....	22
Kvaliteedikontroll ja tulemuste kehtivus	23
Mutatsioonikontroll	23
Negatiivne kontroll	23
Meetodi piirangud.....	23
Mittekliinilise toimivuse hindamine.....	24
Analüütiline tundlikkus – tulemuse puudumise piir	24
Tuvastamispiir FFPET-proovi segusid kasutades	24
Vähkkasvaja minimaalne sisaldus	26
Ristreaktsioonid teiste 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioonidega.....	27
EURTAC kliiniliste uuringute proovid.....	27
AURA2 kliiniliste uuringute proovid	27
Spetsiifilisus – mikroorganismid ja EGFR-i homoloogid.....	27
Kopsuga seotud mikroorganismid	27
EGFR-i homoloogide plasmiidid.....	27
Segavad mõjurid	28
Nekroosne kude	28
Korratavus.....	28
Proovide käsitlemise reprodutseeritavus	28
Kliinilise toimivuse hindamine.....	29
Kliinilise reprodutseeritavuse uuring 1	29
Kliinilise reprodutseeritavuse uuring 2	30
Korrelatsioon standardmeetodiga EURTAC-i uuringu III faasi proovide kasutamisel.....	31
Korrelatsioon standardmeetodiga AURA2 uuringu II faasi proovide kasutamisel.....	33
Kliinilise käigu andmed	34
EURTAC	34
AURA2	35
FLAURA	36

JAOTIS B: KASUTAMINE PLASMAPROOVIDEGA.....	40
Proovi ettevalmistamine	40
Materjalid ja reaktiivid.....	40
Komplekti kuuluvad materjalid ja reaktiivid	40
Reaktiivide säilitamine ja käitlemine	41
Täiendavad vajalikud materjalid	42
Vajalikud seadmed ja tarkvara, mida kaasas ei ole	42
Ettevaatusabinõud ja käitlemise nõuded	43
Hoiatused ja ettevaatusabinõud.....	43
Hea laboritava	43
Saastumine	43
Terviklikkus	44
Utiliseerimine.....	44
Mahavoolamine ja puhastamine.....	44
Proovide võtmine, transportimine ja säilitamine	44
Proovide võtmine ja käitlemine	44
Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus	45
Töödeldud proovide säilitamine ja stabiilsus	45
Testiprotseduur	46
Testi teostamine	46
Kasutusjuhised	46
Tööseeria maht.....	46
Tervikliku protsessi kontroll	46
DNA eraldamine	46
Amplifikatsioon ja tuvastamine	47
Instrumendi seadistamine.....	47
Testi tellimuste seadistamine	47
Reaktsiooni seadistamine.....	48
PCR-i alustamine	49
Tulemused	50
Tulemuste tõlgendamine	50
Poolkvantitatiivne indeks (SQI).....	50
Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine.....	51
Kvaliteedikontroll ja tulemuste kehtivus	51
Mutatsioonikontroll	51
Negatiivne kontroll	51
Meetodi piirangud.....	51

Mittekliinilise toimivuse hindamine.....	53
Analüütilised tulemused.....	53
Analüütiline tundlikkus – tulemuse puudumise piir	53
Tuvastamispiir rakuliini DNA-d kasutades.....	53
Ristreaktsioonid teiste 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioonidega.....	54
AURA Extension ja AURA2 kliinilise uuringu proovid	54
Spetsiifilisus – mikroorganism.....	54
Segavad mõjurid	54
Lineaarsus	55
Korratavus.....	58
Kliinilise toimivuse hindamine.....	59
Kliiniline reprodutseeritavus K2 EDTA plasmaga	59
Kliiniline reprodutseeritavus Roche cfDNA plasmaga	60
Tuvastamispiir (LoD), kasutades NSCLC plasmaproove	61
Roche cfDNA plasma korrelatsioon K2 EDTA plasmaga.....	62
Vastavus standardmeetodiga, kasutades III faasi plasmaproove ASPIRATION-i kohordist.....	63
cobas EGFR testi plasma- ja koeproovide tuvastatud 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni kokkulangevus kasutades III faasi proove ENSURE-ilt	64
Korrelatsioon standardmeetodiga AURA2 uuringu II faasi proovide kasutamisel.....	65
Plasma ja koeproovide kokkulangevus kasutades II faasi AURA2 proove T790M mutatsiooni määramiseks.....	66
Kliinilise käigu andmed	67
ENSURE.....	67
AURA2	69
FLAURA	69
Tulemuste lipud.....	73
Tulemuste lippude seletus.....	73
Lisateave	75
Sümbolid.....	75
Tehniline tugi.....	76
Tootja.....	76
Kaubamärgid ja patendid	76
Autoriõigus	76
Viited	77
Dokumendi redaktsioon	79

Sihtotstarve

Test **cobas**® EGFR Mutation v2 on reaalaaja PCR-i põhine test epidermaalse kasvuteguri retseptori (EGFR – epidermal growth factor) geeni mutatsioonide kvalitatiivseks määramiseks mitteväikerakulise kopsuvähiga (NSCLC – non-small cell lung cancer) patsientidel. EGFR-i mutatsioone määratakse formaliinis fikseeritud ja parafineeritud kasvaja koest (FFPET – formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue) või EDTA-antikoagulandiga perifeerses täisvere plasmast eraldatud rakuvabast kasvaja DNA-st (cfDNA – circulating-free tumor DNA).

Test on näidustatud kasutamiseks diagnostilise lisameetodina, mis võimaldab hinnata NSCLC patsientide sobivust raviks EGFR-i türosiini kinaasi inhibiitoritega vastavalt konkreetse ravimi omadustele (sh allpool loetletud suunatud ravi korral, vt Tab. 1):

Tab. 1

Ravim	FFPET	Plasma
TARCEVA® (erlotiniib)	19. eksoni deletsioon ja L858R	19. eksoni deletsioon ja L858R
TAGRIS® (osimertiniib)	19. eksoni deletsioon, L858R ja T790M	19. eksoni deletsioon, L858R ja T790M
IRESSA® (gefitiniib)	19. eksoni deletsioon ja L858R	19. eksoni deletsioon ja L858R

Plasmaproovide analüüsimine on sobivaim patsientidel, kellelt kasvajabiopsiat ei saa võtta. Patsiente, kes on selle testi plasmaproovidega nende mutatsioonide suhtes negatiivsed, tuleks EGFR-i mutatsioonide suhtes testida tavapärase koebiopsia ja testimismeetodiga FFPET-proovidest, kui võimalik.

Ravimi ohutust ja tõhusust ei ole kontrollitud järgmiste EGFR-i mutatsioonide puhul, mida on samuti võimalik tuvastada süsteemiga **cobas**® EGFR Mutation Test v2.

Tab. 2

Ravim	FFPET	Plasma
TARCEVA® (erlotiniib)	G719X, 20. eksoni insertioonid, T790M, S768I ja L861Q	G719X, 20. eksoni insertioonid, T790M, S768I ja L861Q
TAGRIS® (osimertiniib)	G719X, 20. eksoni insertioonid, S768I ja L861Q	G719X, 20. eksoni insertioonid, S768I ja L861Q
IRESSA® (gefitiniib)	G719X, 20. eksoni insertioonid, T790M, S768I ja L861Q	G719X, 20. eksoni insertioonid, T790M, S768I ja L861Q

Test **cobas**® EGFR Mutation v2 plasmaga kasutamiseks hõlmab poolkvantitatiivset mutatsioonide mõõtmist EGFR-geeni eksonites 18, 19, 20 ja 21. Poolkvantitatiivse indeksina (SQI) raporteeritud mõõde korreleerub sihtmärkmütatsiooni cfDNA kogusega plasmas ning seda saab kasutada, et määrata sihtmärkmütatsiooni cfDNA koormuse muudatused ajas ühel patsiendil.

FFPET-proove töödeldakse komplektiga **cobas**® DNA Sample Preparation Kit ja plasmaproove töödeldakse komplektiga **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit. Automaatseks amplifitseerimiseks ja tulemuste tuvastamiseks kasutatakse analüsaatorit **cobas**® z 480.

Testi ülevaade ja selgitus

Taust

EGFR-i geeni mutatsioonide aktiveerumine toimub peamiselt mitteväikserakulise kopsuvähi (NSCLC) puhul ning tulemuseks on EGFR-proteiini kinaasi aktiivsuse konstitutiivne aktiveerumine, mis soodustab onkogeenset protsessi.¹ Nende mutatsioonide esinemissagedus NSCLC mittevalitud juhtudel on ligikaudu 10–30%.^{2,3} Need mutatsioonid esinevad kõige sagedamini (kuid mitte ainult) adenokartsinoomi histoloogiaga Aasia päritolu mittesuitsetavatel või vähe suitsetavatel naispatsientidel.⁴

Kõige sagedasemad NSCLC korral esinevad EGFR-i mutatsioonid on mitmesugused deletsioonid 19. eksonis ja L858R asendusmutatsioon 21. eksonis. Need mutatsioonid moodustavad umbes 85% NSCLC puhul täheldatud EGFR-i mutatsioonidest.⁵ **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (**cobas** EGFR test) on reaalaaja PCR-test, mis on ette nähtud 18. eksoni asendusmutatsiooni G719X, 19. eksoni deletsioonimutatsioonide, 20. eksoni asendusmutatsioonide T790M ja S768I, 20. eksoni insertioonimutatsioonide ja 21. eksoni asendusmutatsioonide L858R ning L861Q määramiseks.

cobas EGFR testi kasutatakse koos ravimiga TARCEVA® (erlotiniib), mis on EGFR-i kinaasse aktiivsuse inhibiitor, takistades retseptoriga seotud türosiini jääkide autofosforüleerumist ja seega järgnevat signaalirada, mis vastasel juhul aitaks kaasa rakkude elulemusele ja paljunemisele. TARCEVA® sidumise afiinsus EGFR-i 19. eksoni deletsiooni või 21. eksoni L858R mutatsiooni korral on suurem kui tema afiinsus metsiktüüpi retseptori korral.⁶ Kliinilised uuringud on näidanud, et kaugelearenenud NSCLC-ga ja 19. eksoni deletsioonimutatsioonide või 21. eksoni asendusmutatsioonidega L858R-ga patsientidel, keda raviti esmavaliku ravimiga TARCEVA®, võivad esineda kliinilised eelised kemoterapiat saavate patsientide ees.^{3,7}

cobas EGFR testi kasutatakse koos ravimiga TAGRISSO® (osimertiniib), mis on türosiini kinaasi inhibiitorite (TKI) sensitiseerivate mutatsioonide ja T790M resistentsusmutatsioonidega EGFR-i pöördumatu inhibiitor kaugelearenenud mitteväikserakulise kopsuvähi (NSCLC) korral. TAGRISSO® inhibeerib EGFR-i kinaasset aktiivsust, mis omakorda inhibeerib järgnevaid signaaliradasid, mis soodustaksid rakkude paljunemist, elulemust ja angiogeneesi.⁸ Kliinilised uuringud on näidanud, et mitte-skvamoose NSCLC-ga patsiendid EGFR-i TKI-sensitiseerivate mutatsioonidega, kelle haigus on progresseerunud esimese põlvkonna EGFR TKI ravi alustamise järgselt ja kellel on 20. eksonis tekkinud T790M resistentsusmutatsioon, võivad saavutada kliinilisi eeliseid kui neid ravida TAGRISSO® ravimiga.⁹ III faasi kliiniline uuring näitas, et kaugelearenenud NSCLC-ga patsientidel (19. eksoni deletsiooni või 21. eksoni asendusmutatsiooni L858R suhtes positiivne), mida raviti esmavalikuna ravimiga TAGRISSO®, said rohkem kliinilist kasu võrreldes patsientidega, keda raviti esmase põlvkonna EGFR TKI-ga (gefitiniib või erlotiniib).¹⁰

cobas EGFR testi kasutatakse koos ravimiga IRESSA® (gefitiniib), mis on EGFR-i kinaasse aktiivsuse inhibiitor, takistades retseptoriga seotud türosiini jääkide autofosforüleerumist ja seega järgnevat signaalirada, mis vastasel juhul aitaks kaasa rakkude elulemusele ja paljunemisele. Kliinilised uuringud on näidanud, et kaugelearenenud NSCLC-ga ja 19. eksoni deletsioonimutatsioonide või 21. eksoni asendusmutatsioonidega L858R-ga patsientidel, keda raviti esmavaliku ravimiga IRESSA®, võivad esineda kliinilised eelised kemoterapiat saavate patsientide ees.^{11, 12, 13}

Tab. 3 loetleb **cobas** EGFR testiga avastatavad EGFR mutatsioonid.

Tab. 3 cobas EGFR Test on mõeldud järgmiste mutatsioonide avastamiseks

Ekson	EGFR-i mutatsiooni-rühm	EGFR-i nukleiin-happejärjestus	HGVS* valgu nomenklatuur	HGVS* nukleotiidi nomenklatuur	COSMIC ID ¹⁴
18. ekson	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
19. ekson	Ex19Del	2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA	6210
		2239_2247del9	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA	6218
		2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)	LRG_304t1:c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC	6220
		2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)	LRG_304t1:c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	6223
		2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)	LRG_304t1:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	6225
		2239_2253del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)	LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	6254
		2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)	LRG_304t1:c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT	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_2248TTAA GAGAAG>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_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAG GAAAT	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
20. ekson	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
21. ekson	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

Protseduuri põhimõtted

cobas EGFR test põhineb peamiselt kahel protsessil: (1) proovide käsitsi ettevalmistamine DNA saamiseks FFPET-st või plasmast ja (2) sihtmärk-DNA PCR-amplifikatsioon ja tuvastamine komplementaarsete praimeripaaride ja fluorestsentsmärgisega oligonukleotiidsondide abil. **cobas** EGFR test on ette nähtud järgmiste mutatsioonide avastamiseks:

- 18. ekson: G719X (G719A, G719C ja G719S)
- 19. ekson: deletsioonid ja keerulised mutatsioonid (määratletud deletsiooni ja insertiooni kombinatsioonina)
- 20. ekson: S768I, T790M ja insertioonid
- 21. ekson: L858R ja L861Q

Mutatsioonide avastamine toimub PCR-analüüsi abil analüsaatoriga **cobas**® z 480. Iga katseseeria sisaldab katseseeria kehtivuse kinnitamiseks mutatsioonikontrolli ja negatiivset kontrolli.

Proovi ettevalmistamine

cobas® DNA Sample Preparation Kit ja **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit on proovide käsitsi ettevalmistamise komplektid FFPET-proovidest ja plasmast, kus nukleiinhapped seotakse klaaskiududega. Proteaasi ja kaotroopse lüüsi/sidumispuhver vabastab nukleiinhapped ja kaitseb vabanenud DNA-d DNAaside eest. Seejärel lisatakse lüüsisegule isopropanooli ja tsentrifuugitakse segu läbi klaaskiutäidisega kihi. Tsentrifugimise käigus seondub DNA klaaskiudfiltril pinnale. Tsentrifugimisel kõrvaldatakse seondumata ained, nagu soolad, valgud ja muud rakkudest pärinevad lisandid. Adsorbeerunud nukleiinhapped pestakse ja seejärel elueeritakse vesilahusega. Seejärel sihtmärk-DNA amplifitseeritakse ja tuvastatakse analüsaatoril **cobas**® z 480, kasutades **cobas** EGFR testi amplifitseerimis- ja tuvastamiskiektiivide komplekti.

PCR-amplifikatsioon

Sihtmärgi valik

cobas EGFR testi komplektis kasutatakse praimereid, mis määratlevad iga sihtmärkmutatsiooni spetsiifilise aluspaari järjestuse. Sihitakse 19. eksoni deletsioonimutatsiooni 125–141 aluspaariga järjestust; 21. eksoni asendusmutatsiooni L858R 138 aluspaariga järjestust; 20. eksonis T790M asendusmutatsiooni 118 aluspaariga järjestust; 18. eksonis G719X asendusmutatsiooni 104–106 aluspaariga järjestust; 20. eksoni S768I asendusmutatsiooni 133 aluspaariga järjestust; 20. eksoni insertioonimutatsiooni 125–143 aluspaariga; 21. eksoni L861Q asendusmutatsiooni 129 aluspaariga järjestust. Amplifitseeritakse ainult praimerite vahele jäävat ala EGFR-i genoomis; kogu EGFR-i genoomi ei amplifitseerita.

Sihtmärgi amplifikatsioon

Sihtmärgi amplifitseerimiseks kasutatakse liigi *Thermus* Z05-AS1 DNA polümeraasi. Esmalt kuumutatakse PCR-segu DNA denatureerimiseks ja praimeri sihtmärkjärjestuste avamiseks. Segu jahtudes liituvad päri- ja pöördsuunalised praimerid sihtmärk-DNA järjestustele. Z05 DNA polümeraas pikendab divalentse metalli katiooni ja dNTP-de liia juuresolekul iga seondunud praimeri ja sünteesib teise DNA ahela. Sellega lõpeb PCR-i esimene tsükkel, saadakse topeltahelaga DNA-koopia, mis hõlmab ka EGFR-geeni aluspaari sihtmärkalasid. Seda protsessi korratakse mitme tsükli vältel, iga tsükliga kahekordistatakse amplikon-DNA kogust.

Mutatsioonide automaatne reaalaajaline tuvastamine

cobas EGFR test kasutab reaalaaja PCR-tehnoloogiat. Iga reaktsioonis osalev sihtmärgispetsiifiline oligonukleotiidsond on märgistatud reporterina toimiva fluorestsentsvärviga ja kustutusmolekuliga, mis neelab (kustutab) intaktses sondis reporteri fluorestsentsete emissioonide värvid. Iga amplifikatsioonitsükli ajal seondub amplikoni üheahelalise DNA järjestusega komplementaarne sond Z05-AS1, mis seejärel lõhustub DNA polümeraasi 5'-3'-nukleaasse aktiivsuse mõjul. Kui reportervärv on selle nukleaasiaktiivsuse mõjul kustutusvärvist eraldatud, saab mõõta fluorestsentsvalguse iseloomulikku lainepikkust, kui õige valgusspekter ergastab reportervärvi. Testi sihtmärgiks olevate mutatsioonide märgistamiseks kasutatakse nelja erinevat reportervärvi. Seitsme EGFR-järjestuse amplifikatsioonid tuvastatakse üksteisest sõltumatult kolme reaktsiooni käigus, mõõtes spetsiaalsetes optilistes kanalites fluorestsentsvalgust neljal iseloomulikul lainepikkusel.

Selektiivne amplifikatsioon

Sihtnukleiinhapete selektiivne amplifikatsioon proovis saavutatakse **cobas** EGFR testis ensüümiga AmpErase (uratsiil-N-glükosülaas) ja deoksüuridiintrifosfaadiga (dUTP).¹⁵ AmpErase-ensüüm tunneb ära ja lagundab desoksüuridiini sisaldavad DNA ahelad, jättes puutumata tümidiini sisaldava DNA. Looduslikus DNA-s desoksüuridiini ei leidu, aga desoksüuridiintrifosfaadi kui ühe nukleotiidtrifosfaadi kasutamise tõttu põhisegus ühe dUTP-na desoksütümidiintrifosfaadi asemel leidub seda alati amplikonis – seetõttu sisaldab desoksüuridiini ainult amplikon. Desoksüuridiin võimaldab amplikonilisandi enne sihtmärk-DNA amplifikatsiooni AmpErase'i abil lõhkuda. Põhisegureaktiivides sisalduv AmpErase-ensüüm katalüüsib desoksüuridiini sisaldava DNA lõhustamist desoksüuridiinijääkide juures, avades desokü-riboosahela C1-asendis. Amplikoni DNA ahel laguneb kuumutamisel aluselise pH korral esimeses termilise tsükli etapis desoksüuridiini kohalt, muutes DNA mitteamplifitseeritavaks. AmpErase-ensüüm on inaktiivne temperatuuridel üle 55 °C, st termiliste tsüklite etappides, ega lõhu sihtamplikoni. On tõendatud, et **cobas** EGFR test inaktiveerib desoksüuridiini sisaldavat EGFR-i mutatsiooni amplikoni.

KASUTAMISEKS KOEPROOVIDEGA JÄRGIGE JAOTISES A ESITATUD JUHISEID.**KASUTAMISEKS PLASMAPROOVIDEGA JÄRGIGE JAOTISES B ESITATUD JUHISEID.****JAOTIS A: KASUTAMISEKS KOEPROOVIDEGA**

DNA eraldamise kohta koeproovidest vaadake komplekti **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Materjalid ja reaktiivid**Komplekti kuuluvad materjalid ja reaktiivid**

Komplekt/kassetid	Komponendid ja reaktiivi toimeained	Kogus ühes testis	Ohutussümbol ja hoiatus
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 testi (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR põhisegu 1) (M/N 06471366001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA
	EGFR MMX-2 (EGFR põhisegu 2) (M/N 06471382001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA

Komplekt/kassetid	Komponendid ja reaktiivi toimeained	Kogus ühes testis	Ohutussümbol ja hoiatus
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 testi (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR põhisegu 3) (M/N 07248610001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA
	MGAC (Magneesiumatsetaat) (M/N 05854326001) Magneesiumatsetaat 0,09% naatriumasiid	6 × 0,2 ml	NA
	EGFR MC (EGFR mutatsioonikontroll) (M/N 06471455001) Tris-puhver EDTA Poly rA RNA (sünteesiline) 0,05% naatriumasiid < 0,1% plasmiidset DNA-d, mis sisaldab EGFR-i eksoni 18, 19, 20 ja 21 järjestusi (mikroobne) < 0,1% EGFR-i „looduslik” DNA (rakukultuur)	6 × 0,1 ml	NA
	DNA SD (DNA-proovi lahusti) (M/N 05854474001) Tris-HCl puhver 0,09% naatriumasiid	2 × 3,5 ml	NA

Reaktiivide säilitamine ja käitlemine

Reaktiiv	Säilitamistemperatuur	Säilitamisaeg
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2...8 °C	Pärast avamist püsivad stabiilsena 4 kasutuskorda (90 päeva jooksul) või kuni aegumistähtajani, kui see saabub varem.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** ja tööpõhisegu (valmistatud reaktiivi **MGAC** lisamisega reaktiivile **EGFR MMX-1** või reaktiivile **EGFR MMX-2** või reaktiivile **EGFR MMX-3 v2**) tuleb kaitsta pikaajalise kokkupuute eest valgusega. Tööpõhisegu tuleb säilitada pimedas, temperatuuril 2...8 °C. Ettevalmistatud proovid ja kontrollproovid tuleb lisada 1 tunni jooksul alates tööpõhisegu valmistamisest. Amplifikatsiooniga tuleb alustada 1 tunni jooksul alates töödeldud proovide ja kontrollproovide lisamisest tööpõhisegule.

Täiendavad vajalikud materjalid

Materjalid	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Valgendaja	Iga tarnija
70%-line etanool	Iga tarnija
cobas® 4800 süsteemi mikrotiiterplaat (AD-plaat) ja kattekile	Roche 05232724001
cobas® 4800 süsteemi kattekile aplikaator (tarnitakse cobas® 4800 süsteemi paigaldamisel)	Roche 04900383001
Reguleeritavad pipetid* (mahuga 5–1 000 µl)	Iga tarnija
Aerosoolitõkkega varustatud või DNAasi-vabad kolbotsikud	Iga tarnija
Lukustuva kaanega mikrotsentrifuugi katsutid (1,5 ml, steriilne, RNAasi-/DNAasi-vaba, PCR grade)	Iga tarnija
Mikrotsentrifuugi katsutistatiivid	Iga tarnija
Spektrofotomeeter DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks*	Iga tarnija
Vortex-segisti*	Iga tarnija
Ühekordselt kasutatavad talgivabad kindad	Iga tarnija
Külmik säilitustemperatuuriga –25 °C...–15 °C	Iga tarnija

* Kõiki seadmeid tuleb hoida korras vastavalt tootja juhisteile.

Täiendavat teavet eraldi müüdavate materjalide kohta küsige kohalikult Roche esindajalt.

Vajalikud seadmed ja tarkvara, mida kaasas ei ole

Vajalikud seadmed ja tarkvara, ei ole kaasas
Analüsaator cobas® z 480
Süsteemi cobas® 4800 juhtimisseade, mille tarkvaraversioon on 2.2 või uuem
EGFR-i koeanalüüsipakett P1, tarkvaraversioon 1.0 või uuem*
Väline USB-võõtkoodilugeja
Printer

* Praeguse tarkvaraversiooni jaoks vaadake cobas® EGFR Mutation Test v2 komplekti toote infolehte (M/N: 07335873001).

Lisateavet eraldi müüdavate materjalide kohta küsige kohalikult Roche'i esindajalt.

Ettevaatusabinõud ja käitlemise nõuded

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Nagu kõigi testiprotseduuride puhul, on selle analüüsi toimimise eelduseks hea laboritava.

- Kasutamiseks ainult *in vitro* diagnostikas.
- Ohutuskardid (SDS) on saadaval kohalikus Roche esinduses.
- Test on ette nähtud kasutamiseks formaliinis fikseeritud ja parafiini sisestatud (FFPET) NSCLC-proovidega. Proove tuleb käsitleda nakkusohtlikena, rakendades väljaandes Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ ja CLSI dokumendis M29-A4 kirjeldatud laboriohutuseeskirju.¹⁷
- Soovitav on kasutada ühekordselt kasutatavaid pipette ja DNAasi-vabu pipetiotsikuid.

Hea laboritava

- Suu abil mitte pipeteerida.
- Ärge sööge, jooge ega suitsetage laboris.
- Pärast proovide ja komplektireaktiivide käsitlemist tuleb hoolikalt käsi pesta.
- Mis tahes reaktiivide käsitlemisel tuleb kanda kaitseprille, laborikitlit ja ühekordselt kasutatavaid kindaid. Vältige materjalide kokkupuudet naha, silmade ja limaskestadega. Kokkupuute korral tuleb kokkupuutekohta kohe rohke veega pesta. Vastasel korral võivad tekkida põletushaavad. Mahavoolamise korral tuleb mahavoolanud kogus enne ärakuivatamist veega lahjendada.
- Kõik labori tööpinnad tuleb põhjalikult puhastada ja desinfitseerida destilleeritud või deioniseeritud vees värskelt valmistatud 0,5% naatriumhüpokloriti lahusega (lahjendada olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10). Seejärel tuleb pind üle pühkida 70%-lise etanooliga.

Märkus. Müügil olevad olmepleegitusvedelikud sisaldavad üldjuhul 5,25% naatriumhüpokloritit. Lahjendades olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10, saadakse naatriumhüpokloriti 0,5% lahus.

Saastumine

- Proovide ja cobas EGFR testi reaktiivide käsitlemisel tuleb saastumise vältimiseks kanda kindaid. Proovide käsitlemisel tuleb vältida kinnaste saastumist.
- Kinnaste saastumise võimalikkuse vähendamiseks tuleb kindaid sageli vahetada.
- Kindaid tuleb vahetada enne DNA eraldamise alalt lahkumist või kui on alust kahtlustada kokkupuutumist lahuse või prooviga.
- Vältige reaktiivide saastumist mikroobide ja ribonukleasmateljaliga.
- Amplifitseerimise ja tuvastamise tööala tuleb enne tööpõhise ettevalmistamist põhjalikult puhastada. Iga operatsiooni jaoks tuleb kasutada eraldi varusid ja seadmeid, mida ei tohi kasutada muude operatsioonide jaoks ega viia muudesse tööpiirkondadesse. Näiteks ei tohi DNA eraldamiseks mõeldud pipette ja varusid kasutada amplifitseerimiseks ja tuvastamiseks ette nähtud reaktiivide ettevalmistamiseks.
- Soovitav on korraldada labori tööprotsessid ühesuunaliselt, lõpetades ühe tegevuse enne järgmise juurde asumist. Näiteks DNA eraldamine tuleb teostada enne amplifitseerimise ja tuvastamise alustamist. DNA eraldamine tuleb teostada alas, mis on eraldatud alast, kus toimub amplifitseerimine ja tuvastamine. Tööpõhise saastumise vältimiseks DNA-proovidega, tuleb amplifitseerimise ja tuvastamise ala enne tööpõhise ettevalmistamist põhjalikult puhastada.

Terviklikkus

- Ärge kasutage komplekte pärast kõlblikkusaja lõppu.
- Ärge segage kokku eri komplektidest või partiidest pärit reaktiive.
- Ärge kasutage ühekordselt kasutatavaid esemeid pärast nende aegumistähtaega.
- Kõik ühekordselt kasutatavad esemed on mõeldud ühekordseks kasutamiseks. Mitte kasutada korduvalt!
- Kõiki seadmeid tuleb hoida nõuetekohases korras vastavalt tootja juhiste.

Utiliseerimine

- **MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC ja DNA SD** sisaldavad naatrium-asiidi. Naatriumasiid võib reageerida pliist ja vasest äravoolutorudega, moodustades ülimalt plahvatusohtlikke metalliasiide. Naatriumasiidi sisaldavate lahuste labori kraanikausist allavalamise korral tuleb asiidi kogunemise vältimiseks torusid uhtuda suure koguse külma veega.
- Kasutamata reaktiivid ja jäägid tuleb kõrvaldada kooskõlas föderaalsete, riiklike ja kohalike nõuetega.

Mahavoolamine ja puhastamine

- Kui instrumendile **cobas® 4800** satub pritsmeid, järgige puhastamiseks asjakohase süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatu või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabi juhiseid.
- Ärge kasutage analüsaatori **cobas® z 480** puhastamiseks naatriumhüpokloritilahust (pleegitusvedelikku). Järgige analüsaatori **cobas® z 480** puhastamisel asjakohase süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatus või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabis kirjeldatud toiminguid.
- Lisahoiatused, ettevaatusabinõud ja toimingud analüsaatori **cobas® z 480** saastumisohu vähendamiseks leiate süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.

Proovide võtmine, transportimine ja säilitamine

Märkus. Kõiki proove tuleb käsitada potentsiaalselt nakkusohtlikena.

Proovide võtmine

NSCLC FFPET-proovid on valideeritud kasutamiseks **cobas** EGFR Test komplektiga.

Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus

NSCLC FFPET-proove saab transportida temperatuuril 15...30 °C. FFPET-proovide transportimisel tuleb järgida riiklikke, föderalseid, osariigi ja kohalikke nakkusohtlike materjalide transportimise nõudeid.¹⁸

FFPET-proovide stabiilsus on kontrollitud kuni 12 kuu jooksul pärast kogumist, kui proove on säilitatud temperatuuril 15...30 °C. Preparaadiklaasidele kinnitatud 5 µm paksuseid lõike võib säilitada temperatuuril 15...30 °C kuni 60 päeva.

FFPET-proovid on stabiilsed, kas:

FFPET-proovi tüüp	FFPET-plokk	5 µm FFPET-lõik
FFPET-proovide säilitamistemperatuur	15...30 °C	15...30 °C
Säilitamisaeg	Kuni 12 kuud	Kuni 60 päeva

Töödeldud proovide säilitamine ja stabiilsus

Töödeldud proovid (eraldatud DNA) püsivad stabiilsena ühel järgnevatest tingimustest:

Ekstraheeritud DNA säilitamistemperatuur	-15...-25 °C	2...8 °C	15...30 °C
Säilitamisaeg	Külmutatud ja sulatatud kuni 3 korda 60 päeva jooksul	Kuni 14 päeva	Kuni 1 päev

Eraldatud DNA tuleb kasutada ära soovitusliku säilitusaja jooksul või enne DNA eraldamiseks kasutatud komplekti **cobas®** DNA Sample Preparation Kit aegumistähtaega, kui see saabub varem.

07340761001-08ET

Testiprotseduur

Testi teostamine

Joonis 1 cobas EGFR testi tööprotsess cobas® DNA Sample Preparation Kitiga

1	Käivitage süsteem
2	Tehke instrumentide hooldus
3	Võtke säilituskohast proovid ja reaktiivid
4	Deparafineerige proovid
5	Eraldage DNA
6	Elueerige DNA
7	Looge Work Order ja printige plaadi paigutus
8	Valmistage amplifikatsiooni reaktiivid
9	Pange amplifikatsiooni reaktiivid AD-plaadile
10	Pange proov AD-plaadile
11	Sulgege AD-plaat
12	Pange AD-plaat analüsaatorisse cobas® z 480
13	Käivitage tööseeria
14	Vaadake tulemused üle
15	LIS-i kasutades: saatke tulemus LIS-i
16	Võtke materjalid analüsaatorist välja

Kasutusjuhised

Märkus. *cobas EGFR testis tohib kasutada ainult 5 µm paksuseid NSCLC FFPET-lõike, mille pindalast vähemalt 10% moodustab kasvajakude. Kõikidele proovidele, mille pindalast moodustab kasvajakude alla 10%, tuleb pärast deparafineerimist teha makrodissektatsioon.*

Märkus. *Analüsaatori **cobas® z 480** üksikasjalikke kasutusjuhiseid vt süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.*

Tööseeria maht

Üks tööseeria võib hõlmata 1–30 proovi (lisaks kontrollproovid) 96 auguga mikrotiiterplaadi kohta. Kui tööseerias on üle 24 proovi, tuleb kasutada mitut **cobas EGFR** testi komplekti.

cobas EGFR test sisaldab piisavalt reaktiive 8 tööseeria jaoks, milles igaühes on 3 proovi (lisaks kontrollproovid). Seega saab ühe komplektiga testida kuni 24 proovi.

Tervikliku protsessi kontroll

Selleks testiks on vaja tervikliku protsessi negatiivset kontrolli. Töödelge igas katseseerias negatiivset kontrolli samal ajal proovi(de)ga **DNA eraldamise** toimingust alates.

DNA eraldamine

DNA eraldatakse FFPET-proovidest komplekti **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190) kasutades.

Makrodisseksioon

Kui proovi pindalast on vähkkasvajad alla 10%, tuleb proovi ettevalmistamise osana teha selle proovi makrodisseksioon.

DNA koguse määramine

Märkus. DNA kontsentratsiooni tuleb määrata kohe pärast DNA eraldamist ja enne säilitamist.

Märkus. Säilitage DNA põhimaterjali vastavalt juhiste jaotises **Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus**.

1. Segage iga DNA põhimaterjali 5 sekundit vortex-segistis.
2. Määrake DNA kogus spektrofotomeetri abil vastavalt tootja protokollile. Kasutage instrumendi tühiproovina **DNA EB-d** komplektist **cobas®** DNA Sample Preparation Kit. Valik on vähemalt kaks kokkulangevat näitu. Need kaks mõõtmistulemust tohivad erineda üksteisest $\pm 10\%$, kui DNA kontsentratsiooni näitudeks on $\geq 20,0$ ng/ μ l. Kui DNA kontsentratsiooni näidud on $< 20,0$ ng/ μ l, tohivad need kaks mõõtmistulemust erineda ± 2 ng/ μ l. Kui need kaks mõõtmistulemust erinevad üksteisest rohkem kui $\pm 10\%$, juhul kui DNA kontsentratsiooni näitudeks on $\geq 20,0$ ng/ μ l, või rohkem kui ± 2 ng/ μ l, juhul kui DNA kontsentratsiooni näitudeks on $< 20,0$ ng/ μ l, siis tuleb võtta veel 2 näitu, kuni nõuded on täidetud. Seejärel tuleb arvutada nende kahe mõõtmistulemuse keskmine väärtus.

Märkus. Töödeldud negatiivsest kontrollproovist (**NEG**) pärinevat DNA põhimaterjali pole vaja mõõta.

3. Proovide DNA põhimaterjali kontsentratsioon peab **cobas** EGFR testi tegemiseks olema ≥ 2 ng/ μ l. Iga proovi kohta tehakse kolm amplifikatsiooni/tuvastamist, kusjuures igaks amplifitseerimiseks/tuvastamiseks kasutatakse 25 μ l DNA algmaterjali 2 ng/ μ l lahjendust (kokku 50 ng DNA-d).

Märkus. **cobas** EGFR testi tegemiseks peab iga DNA põhimaterjali kontsentratsioon olema vähemalt 2 ng/ μ l. Kui DNA põhimaterjali kontsentratsioon on < 2 ng/ μ l, siis korrake selle proovi puhul deparafineerimist, DNA eraldamist ja DNA koguse määramist, kasutades selleks kahte 5 μ m FFPET-lõiku. Slaidile kinnitatud proovide puhul pange mõlema lõigu kude pärast deparafineerimist ühte katsutisse, katke kude komplekti **cobas®** DNA Sample Preparation Kit kuuluva **TLB** + **PK** seguga ning tehke DNA eraldamine ja kvantifitseerimine. Kinnitamata proovide puhul pange mõlema lõigu kude ühte katsutisse ning tehke deparafineerimine, DNA eraldamine ja kvantifitseerimine. Kui DNA põhimaterjali kontsentratsioon on ikka < 2 ng/ μ l, siis nõudke viitavast kliinilisest asutusest uus FFPET-proovi lõik.

Amplifikatsioon ja tuvastamine

Märkus. Tööpõhisegu saastumise vältimiseks DNA-proovidega tuleb amplifitseerimist ja tuvastamist teha DNA eraldamisest eraldi alal. Amplifitseerimise ja tuvastamise tööala tuleb enne tööpõhisegu ettevalmistamist põhjalikult puhastada. Õigeks puhastamiseks tuleb kõiki pindu (sh reste ja pipeteerijaid) põhjalikult puhastada 0,5% naatriumhüpokloritilahusega ja seejärel 70% etanoolilahusega. Müügil olevad olmepleegitusvedelikud sisaldavad üldjuhul 5,25% naatriumhüpokloriti. Lahjendades olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10, saadakse naatriumhüpokloriti 0,5% lahus.

Instrumendi seadistamine

Analüsaatori **cobas® z 480** üksikasjalikke kasutusjuhiseid vt süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.

Testi tellimuste seadistamine

Üksikasjalikke juhiseid EGFR-töövooetappide kohta vt süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.

Koostage plaadikaart kõikide selle tööseeria proovide ja kontrollproovidega. Lisage ainult koeproove sisaldavas seeriasse mutatsiooni kontrollproov plaadile aukudesse **A01–A03**. Lisage negatiivne kontrollproov plaadile aukudesse **B01–B03**. Seejärel lisage lahjendatud proovid 3 kaupa veergudesse, alates **C01–C03** kuni **H10–H12**, vt Joonis 2.

Testi **cobas** EGFR saab kasutada segatestimisrežiimis (nt EGFR-kude EGFR-plasmaga). Kontrollpositsioonid võivad erineda, olenees valitud testidest ja proovide arvust. Rohkem teavet segatestiseeria seadistamiseks vaadake süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.

Joonis 2 cobas EGFR testi asetus plaadil

Rida / veerg	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

Seletus: MC = mutatsiooni kontrollproov, NEG = negatiivne kontrollproov; S# = proovi ID ja MMX-# vastab põhisegu reaktiivile 1, 2 või 3 v2.

Märkus. Mis tahes proov peab tulemuse andmiseks olema ühe rea kolmes järjestikuses veerus.

Märkus. Tööpõhisegu 1 tuleb lisada plaadil veergudesse 01, 04, 07 ja 10. Tööpõhisegu 2 tuleb lisada plaadil veergudesse 02, 05, 08 ja 11. Tööpõhisegu 3 v2 tuleb lisada plaadil veergudesse 03, 06, 09 ja 12.

Märkus. Ühele plaadile saab lisada kuni 30 proovi. Kui kõikide plaadil olevate proovide töötlemiseks on vaja rohkem kui ühte reaktiivikomplekti, peavad kõik komplektid olema samast partiist.

Proovi DNA põhimaterjali lahjenduse arvutamine

Lahjenduse arvutamine DNA põhimaterjali kontsentratsioonide 2 ng/μl kuni 36 ng/μl kohta

Märkus. Proovidest saadud DNA põhimaterjal tuleb lahjendada vahetult enne amplifitseerimist ja tuvastamist.

Märkus. Iga proovi kohta tehakse kolm amplifikatsiooni/tuvastamise katseseeriat, mille kogumaht on 75 μl (25 μl iga kolme reaktsiooni kohta) DNA põhimaterjali 2 ng/μl lahjendust (kokku 150 ng DNA-d).

1. Arvutage iga proovi jaoks vajalik DNA põhimaterjali maht (μl):

$$\text{DNA põhimaterjali maht } \mu\text{l} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{DNA põhimaterjali kontsentratsioon } [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

2. Arvutage iga proovi jaoks vajalik **DNA SD** maht (μl):

$$\text{DNA SD maht } \mu\text{l} = 90 \mu\text{l} - \text{DNA põhimaterjali maht } \mu\text{l}$$

Näide:

DNA põhimaterjali kontsentratsioon = 6,5 ng/μl

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

Lahjenduse arvutamine DNA põhimaterjali kontsentratsioonide > 36 ng/μl korral

Märkus. Proovidest saadud DNA põhimaterjal tuleb lahjendada vahetult enne amplifitseerimist ja tuvastamist.

Märkus. Iga proovi kohta tehakse kolm amplifikatsiooni/tuvastamise katseseeriat, mille kogumaht on 75 μl (25 μl iga kolme reaktsiooni kohta) DNA põhimaterjali 2 ng/μl lahjendust (kokku 150 ng DNA-d).

1. DNA põhimaterjali kontsentratsioonide korral, mis ületavad 36 ng/μl, kasutage vähemalt 90 μl lahjendatud DNA põhimaterjali valmistamiseks vajamineva DNA SD mahu arvutamiseks järgmist valemit. Selle eesmärk on tagada, et iga proovi korral kasutatakse vähemalt 5 μl DNA põhimaterjali.
2. Arvutage iga proovi kohta DNA SD vajalik maht (μl), et lahjendada 5 μl DNA põhimaterjali kontsentratsioonini 2 ng/μl:

$$\text{DNA SD vajalik maht } (\mu\text{l}) = [(5 \mu\text{l DNA põhimaterjali} \times \text{DNA põhimaterjali kontsentratsioon ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Näide:

DNA põhimaterjali kontsentratsioon = 100 ng/μl

1. DNA SD vajalik maht (μl) = $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Kasutage arvutatud mahus DNA SD-d 5 μl DNA põhimaterjali lahjendamiseks.

Proovi lahjendamine

1. Valmistage DNA lahjenduste jaoks ette vajalik arv 1,5 ml lukustuva kaanega mikrotsentrifuugi katsuteid ja märkige nendele proovi tuvastamiseks vajalik teave.
2. Pipeteerige aerosoolikindla otsikuga pipeteerija abil DNA SD arvutatud kogused vastavalt märgistatud katsutitesse. Pipeteerige 45 μl DNA SD-d lukustuva kaanega mikrotsentrifuugi katsutisse, millele on märgitud NEG.
3. Segage iga DNA põhimaterjali ja negatiivset kontrollproovi vortex-segistis 5–10 sekundit.
4. Pipeteerige aerosoolikindla otsikuga pipeteerija abil (võtke iga pipeteerimise jaoks uus otsik) iga DNA põhimaterjali arvutatud kogus ettevaatlikult vastavasse katsutisse, mis sisaldab proovi lahjendust DNA SD. Pipeteerige 45 μl negatiivset kontrollproovi (eraldatud eluaat) NEG katsutisse.
5. Sulgege katsutid korgiga ja segage vortex-segistis 5–10 sekundit.
6. Vahetage kindad.

Reaktsiooni seadistamine

Tööpõhisegude (MMX-1, MMX-2 ja MMX-3 v2) valmistamine

Märkus. EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ja tööpõhisegu on valgustundlikud ning neid tuleb kaitsta pikaajalise kokkupuute eest valgusega.

Märkus. EGFR MMX-segude ja tööpõhisegu viskoossuse tõttu pipeteerige aeglaselt, et kogu segu väljuks otsikust.

Märkus. EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 ja EGFR MMX-3 v2 võivad olla helesinist või lillakat tooni. See ei mõjuta reaktiivsust.

Valmistage eraldi 1,5 ml lukustuva kaanega mikrotsentrifuugi katsutitesse ette kolm tööpõhisegu, millest üks sisaldab reaktiivi **EGFR MMX-1**, teine reaktiivi **EGFR MMX-2** ja kolmas reaktiivi **EGFR MMX-3 v2**.

1. Arvutage iga tööpõhisegu jaoks reaktiivi **EGFR MMX-1** või **EGFR MMX-2** või **EGFR MMX-3 v2** vajalik maht järgmise valemi abil:

$$\text{Reaktiivi EGFR MMX-1 või EGFR MMX-2 või EGFR MMX-3 v2 vajalik maht} = (\text{proovide arv} + 2 \text{ kontrollproovi} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Arvutage iga tööpõhisegu jaoks vajalik **MGAC** vajalik maht järgmise valemi abil:

$$\text{MGAC vajalik maht} = (\text{proovide arv} + 2 \text{ kontrollproovi} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Vt Tab. 4, et määrata kindlaks iga reaktiivi kogus, mis on vajalik ööpõhisegu valmistamiseks, võttes aluseks katseseeriasse kuuluvate proovide arvu.

Tab. 4 Tööpõhisegude töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks vajalikud reaktiivide kogused

		Proovide arv*									
		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
Iga tööpõhisegu kogumaht (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Proovide arvule vastavate koguste aluseks on järgmine summa: proovide arv + 2 kontrollproovi + 1

3. Võtke 2...8 °C säilituskohast sobiv arv põhisegude **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** ja **MGAC** viaale. Segage iga reaktiivi 5 sekundit vortex-segistis ja koguge enne kasutamist katsuti põhjast vedelik. Märgistage tööpõhisegude töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks steriilne mikrotsentrifuugi katsuti.
4. Lisage arvutatud kogus põhisegu **EGFR MMX-1** või **EGFR MMX-2** või **EGFR MMX-3 v2** vastavasse tööpõhisegu katsutisse.
5. Lisage tööpõhisegu katsutitesse arvutatud kogus **MGAC**-i.
6. Segage piisava segamise tagamiseks katsuteid 3–5 sekundit vortex-segistis.

Märkus. Proovid ja kontrollproovid tuleb lisada AD-plaadile 1 tunni jooksul alates tööpõhisegu valmimisest.

Märkus. Kasutage ainult süsteemi **cobas® 4800 AD**-plaati ja kattekilet.

Plaadi ettevalmistamine

1. Pipeteerige igasse katseseeria jaoks vajalikku AD-plaadi reaktsiooniauku 25 µl tööpõhisegu. Ärge puudutage pipeteerija otsikuga plaati väljaspool auke.
 - Lisage töö-MMX-1 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-1**) AD-plaadi aukudesse veergudes 01, 04, 07 ja 10.
 - Lisage töö-MMX-2 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-2**) AD-plaadi aukudesse veergudes 02, 05, 08 ja 11.
 - Lisage töö-MMX-3 v2 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-3 v2**) AD-plaadi aukudesse veergudes 03, 06, 09 ja 12.
2. Pipeteerige 25 µl kontrollproovi **EGFR MC** AD-plaadi aukudesse **A01**, **A02** ja **A03**; segage põhjalikult pipetiga suspenderides augu sees vähemalt kaks korda (aspireerides segu vähemalt kaks korda).
3. Pipeteerige uue pipeteerijaotsiku abil 25 µl kontrollproovi **NEG** AD-plaadi aukudesse **B01**, **B02** ja **B03**; segage põhjalikult pipetiga suspenderides augu sees vähemalt kaks korda (aspireerides segu vähemalt kaks korda).

Märkus. Igas katseseerias peavad augud **A01**, **A02** ja **A03** sisaldama kontrollproovi (**EGFR MC**) ning augud **B01**, **B02** ja **B03** negatiivset kontrollproovi (**NEG**). Vastasel korral loeb analüsaator **cobas® z 480** katseseeria kehtetuks.

Märkus. *Vahetage vastavalt vajadusele kindaid, et vältida proovide ristsaastumist ja PCR-reaktsiooni katsuti välispinna saastumist.*

4. Kasutades iga lahjendatud proovi DNA jaoks uusi pipeteerijaotsikuid, lisage 25 µl esimese proovi DNA-d AD-plaadi aukudesse **C01**, **C02** ja **C03**; igasse auku proovi DNA lisamisel uut otsikut kasutades segage kõiki auke põhjalikult pipeteerija abil, et augu sees vähemalt kaks korda aspireerida ja doseerida. Korrake seda toimingut iga proovi DNA-ga ja järgige Joonis 2 malli, kuni kõik DNA-proovi lahjendused on AD-plaadile lisatud. Veenduge, et kogu vedelik on kogutud aukude põhja.
5. Katke mikrotiiterplaat (AD-plaat) kattekilega (kuulub plaatide tarnekomplekti). Kasutage kattekile aplikaatorit, et kinnitada kile kindlalt mikrotiiterplaadi (AD-plaadi) külge.
6. Veenduge enne PCR-i alustamist, et kogu vedelik on aukude põhjast kokku kogutud.

Märkus. *Amplifikatsiooni ja tuvastamist tuleb alustada 1 tunni jooksul alates esimese proovi DNA lahjenduse lisamist tööpõhisegule.*

PCR-i alustamine

Üksikasjalikke juhiseid EGFR töövooetappide kohta vt süsteemi **cobas**® 4800 kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas**® 4800 kasutajaabist. Kui ilmub hüpikaken „Select test”, valige suvand „EGFR Tissue P1” ja klõpsake nuppu „OK”.

Tulemused

Tulemuste tõlgendamine

Märkus. Kõik katseseeria ja proovi valideerimised teeb **cobas® 4800** tarkvara.

Märkus. Kehtiv katseseeria võib sisaldada nii kehtivaid kui ka kehtetuid proovide tulemusi.

Nõuetele vastavate tulemustega katseseeria puhul tõlgendatakse proovidega saadud tulemusi vastavalt: Tab. 5.

Tab. 5 cobas EGFR testi tulemuste tõlgendamine

Katsetulemus	Mutatsiooni tulemus	Tõlgendus
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (mutatsioone võib olla rohkem kui üks)	Mutatsioon avastati määratud sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas.
No Mutation Detected (NMD)*	NA	Sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas mutatsiooni ei avastatud.
Kehtetu	NA	Proovi tulemus on kehtetu. Korra kehtetute tulemustega proovide testimist vastavalt jaotises „ Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine ” esitatud juhiste.
Failed	NA	Riist- või tarkvara tõrke tõttu nurjunud katseseeria. Pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohalikku esindusse.

* Tulemus „No Mutation Detected” ei välista mutatsiooni olemasolu sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas, kuna tulemused sõltuvad mutatsioonidega järjestuste protsendimäärast, proovide terviklikkusest, inhibiitorite juuresolekust ja avastamiseks piisava DNA-koguse olemasolust.

Tulemuste lipud on leitavad tulemuste vahekaardilt (ekraan) või lippude veerust (aruanne). Rohkemat teavet vaadake jaotisest **Tulemuste lipud**.

Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine

- Korrake kehtetu proovi DNA põhimaterjali lahjendamist, järgides jaotises **Amplifikatsioon ja tuvastamine** esitatud protseduuride „Proovi DNA põhimaterjali lahjenduse arvutamine” ja „Proovi lahjendamine” juhiseid.
- Pärast DNA põhimaterjali lahjendamist kontsentratsioonile 2 ng/μl (vt „Proovi lahjendamine”) jätkake protseduuriga „Tööpõhisgude (MMX-1, MMX-2 ja MMX-3 v2) valmistamine” ning ülejäänud amplifikatsiooni ja tuvastamise protseduuriga.

Märkus. Kui proov jääb ka pärast uuesti testimist kehtetuks või uue lahjenduse valmistamiseks polnud piisavalt DNA põhimaterjali (vt **Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine**, etapp 1), korrake selle prooviga kogu testiprotseduuri alates deparafineerimisest ja DNA eraldamisest, kasutades uut 5 μm paksust FFPET-kasvaja lõiku.

Kvaliteedikontroll ja tulemuste kehtivus

Igas 30 prooviga katseseerias on üks komplekt **cobas** EGFR testi mutatsiooni kontrollproove (**EGFR MC**) (augud **A01**, **A02** ja **A03**) ja negatiivseid kontrollproove (**NEG**) (augud **B01**, **B02** ja **B03**) töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks. Katseseeria on kehtiv, kui **EGFR MC** ja **NEG** on kehtivad. Kui **EGFR MC** või **NEG** tulemused on kehtetud, on kogu katseseeria kehtetu ning seda tuleb korrata. Valmistage varem eraldatud proovi DNA põhimaterjalist uus lahjendus, et seadistada uus AD-plaat kontrollproovidega amplifikatsiooniks ja tuvastamiseks.

Mutatsioonikontroll

EGFR MC tulemus peab olema „Valid”. Kui **EGFR MC** kontrolliga saadakse järjepidevalt kehtetuid tulemusi, pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohalikku esindusse.

Negatiivne kontroll

NEG tulemus peab olema „Valid”. Kui **NEG** kontrolliga saadakse järjepidevalt kehtetuid tulemusi, pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohalikku esindusse.

Meetodi piirangud

1. Analüüsida tuleb ainult ettenähtud proovitüüpe. **cobas** EGFR test on valideeritud kasutamiseks ainult koos NSCLC FFPET-kasvajaproovidega.
2. **cobas** EGFR-test on valideeritud kasutamiseks ainult koos komplektiga **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Mutatsiooni avastamine sõltub koopiaste arvust proovis ja seda võivad mõjutada proovi terviklikkus, eraldatud DNA kogus ja segavate ainete juuresolek.
4. Tulemuste usaldusväärsus sõltub proovide fikseerimise, transportimise, säilitamise ja töötlemise kvaliteedist. Järgige komplekti **cobas**® DNA Sample Preparation Kit kasutusjuhises (M/N 05985536190), selles kasutusjuhises ja süsteemi **cobas**® 4800 kasutaja käsiraamatus või süsteemi **cobas**® 4800 kasutajaabist kirjeldatud toiminguid.
5. Muude võimalike mõjurite (nt proovi kinnitamise mõjurite) toimet ei ole uuritud.
6. AmpErase-ensüümi lisamine testi **cobas** EGFR Mutation põhiseigule võimaldab sihtmärk-DNA-d valikuliselt amplifitseerida. Siiski on reaktiivide saastumise vältimiseks vaja järgida häid laboritöötavasid ja käesoleva kasutusjuhendi juhiseid.
7. Seda toodet tohivad kasutada vaid PCR-meetodit ja süsteemi **cobas**® 4800 väljaõppe saanud töötajad.
8. Selle tootega kasutamiseks on valideeritud ainult analüsaator **cobas**® z 480. Muid reaajas optilise määramisega termotsüklereid ei tohi selle tootega kasutada.
9. Tehnoloogiate sisemiste erinevuste tõttu on soovitatav, et kasutaja teeks enne ühelt tehnoloogialt teisele lülitumist oma laboris tehnoloogiate erinevuste hindamiseks meetodi korrelatsiooniuuringu.
10. PCR-i inhibiitorite esinemine võib põhjustada valenegatiivseid või kehtetuid tulemusi.
11. **cobas** EGFR testi praimerite ja/või sondidega kaetud EGFR-i geeni genoomse DNA piirkondades tekkinud mutatsioonid võivad tingida mutatsiooni olemasolu tuvastamise ebaõnnestumise eksonites 18, 19, 20 ja 21 (tulemus „No Mutation Detected”), kuigi seda esineb harva.
12. **cobas** EGFR test näitab ristreaktiivsust (tulemus „Mutation Detected”) 19. eksoni L747S-mutatsiooni, mis on haruldane omandatud mutatsioon, mis võib anda resistentsuse TKI-ravi suhtes.¹⁹
13. **cobas** EGFR test on valideeritud kasutamiseks koos 50 ng DNA-ga reaktsiooniaugu kohta. 50 ng väiksemad DNA kogused reaktsiooniaugu kohta pole soovitatavad.

14. **cobas** EGFR test on kvalitatiivne test. Test ei ole ette nähtud mutatsiooniprotsendi kvantitatiivseks mõõtmiseks.
15. Lagunenud DNA-d sisaldavad NSCLC FFPET-proovid võivad mõjutada testi suutlikkust EGFR-i mutatsioone tuvastada.
16. Proovid, mille kohta registreeritakse tulemus „No Mutation Detected”, võivad sisaldada EGFR-i mutatsioone, mida katse ei tuvasta.
17. **cobas** EGFR test avastab EGFR mutatsioone NSCLC-kasvajaga patsientidel, kelle kasvajatel on 18. eksoni (G719X) asendused, 19. eksoni deletsioonid, 20. eksoni insertioonid ja asendused (T790M, S768I) ja 21. eksoni asendused (L858R, L861Q), kuid mitte muid EGFR mutatsioone.

Mittekliinilise toimivuse hindamine

Märkus. Allpool kirjeldatud uuringud sisaldavad **cobas** EGFR testist v1 ja v2 saadud kumulatiivseid andmeid.

Allpool kirjeldatud mittekliinilistes uuringutes hinnati kasvaja protsenti patoloogilise ülevaatusega. Testitavate proovide valimiseks kasutati kahesuunalist Sangeri sekveneerimist ja järgmise põlvkonna sekveneerimist (NGS). NSCLC FFPET-proovi mutatsiooniprotsendi määramiseks kasutati NGS-meetodit.

Analüütiline tundlikkus – tulemuse puudumise piir

cobas EGFR testi toimivuse hindamiseks ilma matriitsita ja tagamaks, et tulemuseta proov ei loo analüütilist signaali, mis võib osutada mutatsiooni madalale kontsentratsioonile, hinnati ilma matriitsita proove ja NSCLC FFPET EGFR metsiktüübi proove. Suunises CLSI EP17-A2²⁰ ette nähtud analüüsi kasutades tehti kindlaks, et tulemuse puudumise piir on kõikide mutatsioonide puhul null.

Tuvastamispiir FFPET-proovi segusid kasutades

19. eksoni deletsioonmutatsiooni jaoks segati kolm FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi, L858R mutatsiooni jaoks segati neli FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi, L858R ja T790M mutatsioonide jaoks segati kaks topeltmutatsiooniga FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi, G719A mutatsiooni jaoks segati kaks FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi, T790M ja G719A jaoks segati üks topeltmutatsiooniga FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proov, G719C ja S768I mutatsiooni jaoks segati üks topeltmutatsiooniga FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proov, S768I ja G719S jaoks segati üks topeltmutatsiooniga FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proov, 20. eksoni insertioonmutatsiooni jaoks segati kolm FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi ning L861Q mutatsiooni jaoks segati kolm FFPET-proovi ekstraheeritud DNA-proovi EGFR-i metsiktüübi FFPET-proovi ekstraheeritud prooviga, et saada segu, mille proovides oleks sihtmärgiks 10%, 5,0%, 2,5% ja 1,25% mutatsioonitase, mis määrati kindlaks järgmise põlvkonna sekveneerimise (NGS) meetodi abil, mis on valideeritud kasutamiseks 18., 19., 20. ja 21. eksoni EGFR mutatsioonide avastamiseks. Proovisegudest valmistati lahjendusseeriad ja **cobas** EGFR testi kõigi kolme komplekti partii abil testiti iga paneeliliikme kaheksat paralleelproovi (n = 24/paneeliliige). Iga proovi tuvastamispiir määrati kõige väiksema DNA-koguse alusel, mis andis sihtmärgiks oleva mutatsiooni korral EGFR-i tulemuse „Mutation Detected” vähemalt 95% juhtudel (vt Tab. 6).

Tab. 6 cobas EGFR testi tuvastamispiir FFPET-proovi segusid kasutades

EGFR-i ekson	EGFR-i mutatsiooni-rühm	EGFR-i nukleiinhappejärjestus	Paneeliliikme mutatsiooniprotsent, et saavutada 50 ng DNA-ga reaktsioonიაუი kohta $\geq 95\%$ juhtudest tulemus „Mutation Detected” (N = 24 paralleelproovi)	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	19. eksoni deletsioon	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	Ei leitud
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
	20. eksoni insertioon	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

* Neid EURTAC-i kohordis olevate 19. eksoni mittepeamisi deletsioonmutatsioone testiti ainult ligikaudu 5% mutatsiooni ühel sihttasemel. Proovi DNA-segusid testiti 3 uuringukeskuses.

** **cobas** EGFR testi tuvastamispiir selle mutatsiooni tuvastamisel on standardkoguse (50 ng reaktsioonიაუი kohta) kasutamisel üle 10% mutatsioonitase.

See uuring näitab, et **cobas** EGFR Test suudab standardkoguse (50 ng reaktsioonიაუი kohta) kasutamisel tuvastada EGFR-i 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioone vähemalt 5% mutatsioonitaseme korral.

Vähkkasvaja minimaalne sisaldus

NSCLC-proovides EGFR-i mutatsiooni tuvastamiseks nõutava kasvaja minimaalse pindala kindlaksmääramiseks testiti kokku 66 sõltumatut EGFR-i mutatsiooniga proovi (st 35 19. eksoni mutatsiooni ja 31 21. eksoni L858R-mutatsiooni), milles kasvaja pindala oli vahemikus 25–99%. Üheski uuritud proovis polnud korraga nii 19. eksoni deletsiooni kui ka 21. eksoni L858R-mutatsiooni. Iga proovi testiti ilma makrodissektatsioonita (esialgsel kujul) ja pärast makrodissektiooni. Esialgsel kujul koelõikudes ja makrodissekteeritud lõikudes täheldatud CtR-väärtusi analüüsiti Demingi regressiooni ja Bland-Altmani graafiku abil (erinevused vs. keskmine). Tulemused toetavad selliste proovide kasutamist, milles kasvaja pindala on suurem kui 25%, ilma makrodissektatsioonita.

Testiti veel 10 EGFR-i metsiktüübi NSCLC-proovi (1–90% kasvaja pindala) ja 10 EGFR-i mutatsiooni proovi (8–95% kasvaja pindala), et teha kindlaks, kas väikese kasvaja pindalaga NSCLC kasvajakoe makrodissektatsioon suurendaks **cobas** EGFR testi avastamismäära. Iga proovi testiti ilma makrodissektatsioonita (esialgsel kujul) ja pärast makrodissektiooni. Kõik makrodissektatsiooniga testi tulemused vastasid ilma makrodissektatsioonita testi tulemustele ja kõigi 20 proovi puhul täheldati eeldatavaid mutatsiooni ja metsiktüübi tulemusi.

EURTAC-i erlotiniibi- ja tsisplatiinipõhise kemoterapia võrdlusuuringu III faasis makrodissekteeriti NSCLC FFPET-proove, mille kasvaja pindala oli alla 10%, enne EGFR mutatsioonianalüüsi. EURTAC-i sõelutud proovide ühte alamrühma uuriti EGFR-i mutatsiooni oleku suhtes nii **cobas** EGFR testi abil kui ka järgmise põlvkonna sekveneerimise (NGS) meetodil. Tab. 7 ja Tab. 8 esitavad ühendatult NSCLC-proovide EGFR-i 19. eksoni või L858Ri mutatsioonide **cobas** EGFR testi kui ka NGS-sekveneerimise tulemusi. Kasutades standardmeetodina NGS-i, näitasid tulemused, et väiksema kui 10% kasvajapindalaga NSCLC FFPET-lõikude makrodissektiooni analüütiline täpsus oli võrreldav makrodissekteerimata NSCLC FFPET-lõiguga.

Koos toetavad need uuringud seisukohta, et alla 10% kasvajapindalga NSCLC FFPET-lõikude puhul tuleb enne **cobas** EGFR testi teha makrodissektatsioon.

Tab. 7 cobas EGFR testi toimivus NSCLC FFPET-proovide puhul, mille kasvaja pindala on ≤ 10% (makrodissekteeritud)

Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	97,2% (35/36)	85,8%, 99,5%
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	94,5% (52/55)	85,1%, 98,1%
Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	95,6% (87/91)	89,2%, 98,3%

Tab. 8 cobas EGFR testi toimivus NSCLC FFPET-proovide puhul, mille kasvaja pindala on > 10% (makrodissekteerimata)

Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	93,0% (107/115)	86,9%, 96,4%
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	98,5% (199/202)	95,7%, 99,5%
Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	96,5% (306/317)	93,9%, 98,1%

Ristreaktsioonid teiste 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioonidega

EURTAC kliiniliste uuringute proovid

cobas EGFR test andis „Mutation Detected” tulemuse järgnevatele EGFR-i mutatsioonidele EURTAC kliiniliste uuringute proovides (Tab. 9). **cobas** EGFR testi analüütilisi tulemusi nende mutatsioonide määramisel ei ole hinnatud.

Tab. 9 Mutatsioonid, mis esinevad EURTAC kohordis ja ristreageerivad cobas EGFR testiga

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Ei leitud
	2236_2244del9	E746_R748>E	Ei leitud
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Ei leitud
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Ei leitud

AURA2 kliiniliste uuringute proovid

cobas EGFR-test andis „Mutation Detected” tulemuse järgnevale EGFR-i mutatsioonile AURA2 kliiniliste uuringute proovides (Tab. 10). **cobas** EGFR-testi analüütilisi tulemusi selle mutatsiooni määramisel ei ole hinnatud.

Tab. 10 Mutatsioonid, mis esinevad AURA2 kohordis ja ristreageerivad cobas EGFR testiga

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	COSMIC ID ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Spetsiifilisus – mikroorganismid ja EGFR-i homologid

cobas EGFR testi spetsiifilisuse hindamiseks testiti kopsuga seotud mikroorganisme ja EGFR-i homologide plasmide, st plasmide, mis sisaldavad järjestusi igast HER2, HER3 ja HER4 geneetilisest regioonist analoogselt järjestustele EGFR-i 18., 19., 20. ja 21. eksonis, mida amplifitseeritakse **cobas** EGFR testiga.

Kopsuga seotud mikroorganismid

Streptococcus pneumoniae ja *Haemophilus influenzae* kolooniat moodustavate ühikute hulga 4×10^5 puhul ei täheldatud ristreaktsiooni ega takistavat mõju **cobas** EGFR testile juhul, kui mikroorganismid lisati koelüüsi ajal looduslikku tüüpi ja muteerunud EGFR-i järjestusi sisaldavatele proovidele.

EGFR-i homologide plasmiidid

Struktuuriliselt seotud epidermaalse retseptori proteiini türosiinkinaasi analoogi järjestused (EGFR/HER1, HER2, HER3 ja HER4) on näidanud, et ristreaktiivsust **cobas** EGFR testiga ei esine, kui enne amplifitseerimis-/tuvastamisprotseduuri lisati eraldatud DNA põhimaterjalile potentsiaalselt ristreaktiivne järjestus genoomsete koopiade arvu tasemel, mis oli samaväärne sisendiga 50 ng/PCR. Lisati kontrollitingimus ilma plasmidi DNA-ta. Tulemused näitasid, et kõigi 15 testitud FFPET-proovi puhul täheldatud mutatsioonid vastasid sekveneerimisega määratavale eeldatavale mutatsioonile nii lisatud HER-geeni plasmidi DNA olemasolu kui ka puudumise korral. Lisaks testiti EGFR-i 19. eksoni mutatsiooni L747S ristreaktiivsuse suhtes. Tulemused näitasid, et **cobas** EGFR test ristreageerib EGFR-i 19. eksoni mutatsiooniga L747S.

Segavad mõjurid

Triglütseriidide (37 mM, CLSI soovitatav suur kontsentratsioon²¹) ja hemoglobiini (2 mg/ml, CLSI soovitatav suur kontsentratsioon²¹) puhul ei täheldatud segavat mõju **cobas** EGFR testile, kui proovi ettevalmistamisel lisati koelüüsi ajal potentsiaalselt segav aine.

Albuterooli (Ventolin), ipratroopiumi (Atrovent), fluticasooni (Flonase), tseftasidiimi (Fortaz), imipeneem-tsilastatiini (Primaxin), piperatsilliin-tasobaktaami, tsilastatiini (Cilastatin sodium), betadiini ja lidokaiini puhul ei täheldatud segavat mõju **cobas** EGFR testile, kui proovi ettevalmistamisel lisati need koelüüsi ajal.

Nekroosne kude

On tõendatud, et NSCLC FFPET-proovid kuni 60% nekroosse koe pindalaga EGFR-i mutatsiooni puhul ja 85% nekroosse koe pindalaga metsiktüübi proovide puhul ei takista **cobas** EGFR testi tulemusi.

Korratavus

cobas EGFR testi korratavuse hindamiseks kasutati kuut FFPET-proovi, sh kahte EGFR-i metsiktüübi proovi; nelja EGFR-i mutatsiooni proovi, ühte igast järgmisest mutatsioonist: 19. eksoni deletsioon, S768I ja G719X, T790M ja L858R ning 20. eksoni insertioon. Kaks töötajat testisid neid proove kahes eksemplaris, kasutades nelja päeva jooksul kahte reaktiivipartiid ja kahte analüsaatorit **cobas**® z 480. Kokku hinnati iga proovi kohta 32 paralleelproovi. **cobas** EGFR testi õigete hinnangute täpsus oli 96,9% (186/192).

cobas EGFR testi korratavust hinnati ka teises uuringus, milles kasutati nelja FFPET-proovi, sh ühte EGFR-i metsiktüübi proov, kolme EGFR-i mutatsiooni FFPET-proovi, ühte igast järgmisest mutatsioonist: L861Q, G719X ja 20. eksoni insertioon. Kaks töötajat testisid neid proove kahes eksemplaris, kasutades mitme päeva jooksul kahte reaktiivipartiid ja kahte analüsaatorit **cobas**® z 480. **cobas** EGFR testi õigete hinnangute täpsus kõikide paralleelproovide, töötajate, reaktiivipartiide ja instrumentide kaupa oli kokku 99,2% (127/128).

Proovide käsitlemise reprodutseeritavus

Komplekti **cobas**® DNA Sample Preparation Kit reprodutseeritavust uuriti kolmest FFPET-proovide plokist võetud lõikude abil, millest üks sisaldas 19. eksoni deletsiooni mutatsiooni, teine mutatsiooni L858R ja kolmas metsiktüüpi mutatsiooni. Iga proovi testiti iga päev igas uurimisasutuses kahes eksemplaris. Konkreetse proovi lõigud randomiseeriti ja neid testiti kuue päeva pikkusel perioodil kolmes uurimisasutuses, kusjuures igas asutuses osales üks töötaja, kasutati ühte analüsaatorit **cobas**® z 480, kolme **cobas**® DNA Sample Preparation Kiti partiid ja ühte **cobas** EGFR testi partiid. Igal testipäeval eraldas ja testis iga töötaja iga proovi kahest NSCLC FFPET-lõigust võetud DNA-d **cobas** EGFR testiga. Kõik proovid andsid kogu kuuepäevase testiperioodi jooksul kehtivad ja õiged tulemused. Kõikide proovide ja töötajate puhul kokku oli **cobas** EGFR testi õigete hinnangute täpsus 100% (108/108).

Kliinilise toimivuse hindamine

Kliinilise reprodutseeritavuse uuring 1

Väline uuring tehti eesmärgiga hinnata testi **cobas** EGFR reprodutseeritavust 3 välise testimiskoha (2 töötajat ühe koha kohta), 3 reaktiivipartii ja 5 mittejärjestikuse testimispäeva lõikes, kasutades NSCLC metsiktüüpi (WT) ja mutantsete (MT) kasvajaaproovide FFPE-lõikudest saadud 13-liikmelist DNA-proovide paneeli. See paneel sisaldas 21. eksoni mutatsiooni L858R ja 19. eksoni viit erinevat deletsioonmutatsiooni. 92 seeriast 90 (97,8%) olid kehtivad. 90 kehtiva seeria käigus tehti iga paneelitüübi 13 paneeliliikmega 2340 testi. Kõik testitulemused olid kehtivad. Metsiktüüpi paneeliliikmete 180 kehtivate tulemustega testis polnud ühtki tulemust „Mutation Detected”, seega oli kokkulangevus 100%. 12 mutantsest paneeliliikmest oli 10 juhul 100% kokkulangevus. Paneeliliikme „EX19_2240_2257del18 – 5% mutatsioon” puhul oli kokkulangevus 62,8% (67/180 testitulemusest oli „No Mutation Detected”). Paneeliliikme „EX19_2240_2257del18 – 10% mutatsioon” puhul oli kokkulangevus 99,4% (1/180 testitulemusest oli „No Mutation Detected”). Tulemused vastavalt üldisele kokkulangevusele on esitatud allpool (vt Tab. 11). Kõigi mutatsioonipaneeli liikmete variatsioonikordaja (VC) oli < 6%. Iga paneeliliikme sees oli CV < 3,5%. Väliste kontrollproovide üldine CV oli < 1,3%. Partiidevaheline CV oli < 0,5% ja partiidesisene CV < 1,2%.

Tab. 11 cobas EGFR testi reprodutseeritavus uuring 1 paneeliliikmete hinnanguline üldine kokkulangevus

Paneeliliige	Kehtiva tulemuse andnud testide arv	Kokkulangevus (N)	Kokkulangevuse % (95% CI) ^a
Metsiktüüp	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – 5% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – ≤ 10% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – 5% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – ≤ 10% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – 5% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – ≤ 10% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – 5% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – ≤ 10% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 – 5% mutatsioon	180	113	62,8 (55,3, 69,9)*
EX19_2240_2257del18 – ≤ 10% mutatsioon	180	179	99,4 (96,9, 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R – 5% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R – ≤ 10% mutatsioon	180	180	100 (98,0, 100,0)

Märkus. Tulemused langesid kokku, kui mutantne paneeliliige andis kehtiva tulemuse „Mutation Detected” või metsiktüüpi paneeliliige andis kehtiva tulemuse „No Mutation Detected”.

^a 95% CI = 95% täpne binominaalne usaldusvahemik.

* **cobas** EGFR testi analüütiline tundlikkus selle mutatsiooni tuvastamisel on standardkoguse (50 ng reaktsioonიაugu kohta) kasutamisel üle 10% mutatsioonitase.

Kliinilise reprodutseeritavuse uuring 2

Väline uuring tehti eesmärgiga hinnata testi **cobas** EGFR reprodutseeritavust 3 testimiskoha (2 välist ja 1 sisemine, 2 töötajat ühe koha kohta), 3 reaktiivipartii ja 5 mittejärjestikuse testimispäeva lõikes, kasutades NSCLC metsiktüüpi (WT) ja mutantsete kasvaproovide FFPET-lõikudest saadud 11-liikmelist DNA-proovide paneeli. See paneel sisaldas 18. eksoni G719X mutatsiooni, 20. eksoni T790M mutatsiooni, 20. eksoni S768I mutatsiooni, 20. eksoni insertiooni-mutatsiooni ja 21. eksoni L861Q mutatsiooni. 91 seeriast 90 (98,9%) olid kehtivad. 90 kehtiva seeria käigus tehti iga paneelitüübi 11 paneeliliikmega 1980 korduvat testi. Kõik testitulemused olid kehtivad. Metsiktüüpi paneeliliikmete 180 kehtivate tulemustega testis polnud ühtki tulemust „Mutation Detected”, seega oli kokkulangevus 100%.

Kokkulangevus kõigi mutatsiooniga paneeliliikmete vahel oli 100%, välja arvatud 20. eksoni insertiooni LoD paneeli puhul. Tulemused vastavalt üldisele kokkulangevusele on esitatud allpool (vt Tab. 12). Kõigi mutatsioonipaneeli liikmete variatsioonikordaja (CV) oli < 9,2%. Väliste kontrollproovide üldine CV oli ≤ 1,3%. Partiidevaheline CV oli ≤ 0,6% ja partiidesisene ≤ 1,1%.

Tab. 12 cobas EGFR testi reprodutseeritavus uuring 2 paneeliliikmete hinnanguline üldine kokkulangevus

Paneeliliige	Kehtiva tulemuse andnud testide arv	Kokkulangevus (N)	Kokkulangevuse % (95% CI)*
Metsiktüüp	180	180	100 (98,0, 100,0)
18. eksoni G719X – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni T790M – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni S768I – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni insertioon – LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
21. eksoni L861Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
18. eksoni G719X – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni T790M – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni S768I – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
20. eksoni insertioon – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
21. eksoni L861Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Märkus. Tulemused langesid kokku, kui mutantne paneeliliige andis kehtiva tulemuse „Mutation Detected” või metsiktüüpi paneeliliige andis kehtiva tulemuse „No Mutation Detected” (NMD).

* 95% CI = 95% täpne binominaalne usaldusvahemik.

CI = usaldusvahemik; LoD = tuvastamiskiir (Limit of Detection); NMD = mutatsiooni ei tuvastatud (No Mutation Detected)

Korrelatsioon standardmeetodiga EURTAC-i uuringu III faasi proovide kasutamisel

Testi **cobas** EGFR kliinilise toimivuse hindamiseks võrreldi seda kahe standardmeetodiga: 2 × kahesuunaline Sangeri sekveneerimise ja kvantitatiivse järgmise põlvkonna sekveneerimisega (NGS). Kasutati 487 formaliinis fikseeritud ja parafineeritud kopsuvähi kasvaproovi, mis pärinesid kaugele arenenud NSCLC-kasvajaga patsientidelt, kes sõeluti EURTAC-i TARCEVA® (erlotiniib) ja tsisplatiinipõhise kemoterapia võrdlusuuringu III faasis.^{6, 22} Nende patsientide kliinilised ja demograafilised näitajad, kelle proovid olid selleks retrospektiivseks testimiseks saadaval, olid võrreldavad nende muidu kõlblike patsientidega (557), kelle proovid polnud uuesti testimiseks saadaval.

EURTAC-i uuringu jaoks sõeluti 1276 patsienti, kasutades laboris väljatöötatud testide kombinatsiooni, mida kokkuvõtvalt nimetatakse kliinilise uuringu katseteks (CTA). Pärast mittekõlblikke ja CTA tulemusteta patsientide väljajätmist olid selle uuringu jaoks potentsiaalselt kõlblikud 1044 patsienti. 1044 kõlblikust patsiendist olid CTA põhjal 225 patsiendi proovid mutantset, 792 patsiendi proovid olid metsiktüüpi ja 27 patsiendi proovid ei andnud üheseid tulemusi. 1044 potentsiaalselt kõlblikust patsiendist olid **cobas** EGFR testiga uuesti testimiseks saadaval 487 proovi.

Kõiki 487 proovi testiti pimemeetodil nii **cobas** EGFR testi kui ka Sangeri sekveneerimisega. Neist 406 andsid kehtivad tulemused nii **cobas** EGFR testi kui ka Sangeri sekveneerimisega, 38 juhul andis **cobas** EGFR test ja Sangeri sekveneerimine kehtetu tulemuse, 38 juhul täheldati kehtetu tulemust ainult Sangeri sekveneerimisel ja 5 juhul andis kehtetu tulemuse ainult **cobas** EGFR test. Uuesti testimiseks saadaolevast 487 proovist andsid **cobas** EGFR testiga kehtivad **cobas** EGFR testi tulemused 444 proovi ja neid testiti ka NGS-iga. Neist 36 andsid NGS-iga kehtetu tulemuse. Seega oli 408 proovi tulemused kehtivad nii **cobas** EGFR testi kui ka NGS-i puhul. **cobas** EGFR testi analüütilise täpsuse analüüsimiseks võrreldes iga standardmeetodiga hinnati 19. eksoni deletsioonide ja L858R mutatsioonide positiivsete tulemuste protsentuaalset kokkulangevust (PPA), negatiivsete tulemuste protsentuaalset kokkulangevust (NPA) ja üldist protsentuaalset kokkulangevust (OPA) ning nende vastavaid 95% usaldusvahemikke kokkuvõtlikult ja eraldi.

EURTAC-i kohordis avastati **cobas** EGFR testiga EGFR-i geeni 19. ja 21. eksonites järgmised mutatsioonid (vt Tab. 13). EURTAC-i kohordis avastatud mutatsioonide puhul on analüütiline tundlikkus tõendatud eespool loetletud mutatsioonide näitel (vt Tab. 6).

Tab. 13 cobas EGFR testiga EURTAC-i kohordis avastatud mutatsioonid

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	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	Ei leitud
	2236_2244del9	E746_R748>E	Ei leitud
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Ei leitud
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Ei leitud
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Ei leitud
21	2573 T>G	L858R	6224

Kokkulangevusanalüüs hõlmas kokku 406 proovi, mis andsid kehtivad tulemused nii **cobas** EGFR testi kui ka Sangeri sekveneerimisega. Kokkuvõttlikult oli **cobas** EGFR testi ja Sangeri sekveneerimise vaheline PPA 19. eksoni deletsioonide ja L858R mutatsioonide avastamisel 96,6% (95% CI: 91,5%–98,7%) ja NPA 88,3% (95% CI: 84,1%–91,5%) (vt Tab. 14). OPA oli 90,6%, kusjuures 95% usaldusvahemiku alampiir oli üle 87%. 19. eksoni deletsioonimutatsioonide avastamise PPA, NPA ja OPA olid kõik > 92%. Võrreldud L858R mutatsioonide avastamise PPA, NPA ja OPA olid kõik > 95%.

Tab. 14 cobas EGFR testi ja Sangeri sekveneerimise võrdlus EGFR-i 19. eksoni deletsioonide ja L858R mutatsiooni avastamisel

Mutatsioon	Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
19. eksoni deletsioon	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	97,3% (71/73)	90,5%, 99,2%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	92,5% (308/333)	89,2%, 94,9%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	93,3% (379/406)	90,5%, 95,4%
L858R	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	95,3% (41/43)	84,5%, 98,7%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	97,5% (354/363)	95,4%, 98,7%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	97,3% (395/406)	95,2%, 98,5%
Kokkuvõttlikult	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	96,6% (112/116)	91,5%, 98,7%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	88,3% (256/290)	84,1%, 91,5%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	90,6% (368/406)	87,4%, 93,1%

Kokkulangevusanalüüs hõlmas kokku 408 proovi, mis andsid kehtivad tulemused nii **cobas** EGFR testi kui ka NGS-i sekveneerimisega. Võrdluseks, **cobas** EGFR testi ja NGS-i vaheline PPA ja NPA oli 19. eksoni deletsioonide ja L858R punktmutatsiooni avastamisel kokkuvõttlikult vastavalt 94,0% (95% CI: 89,1%–96,8%) ja 97,7% (95% CI: 95,0%–98,9%) (vt Tab. 15). OPA oli 96,3%, kusjuures 95% usaldusvahemiku alampiir oli 94,0%. 19. eksoni deletsioonimutatsioonide avastamise PPA, NPA ja OPA olid kõik üle > 95%, kusjuures 95% usaldusvahemiku alampiir oli kõigil juhtudel > 90%. L858R mutatsiooni avastamise PPA, NPA ja OPA olid samuti kõik > 95% ja 95% usaldusvahemiku alampiir kõigil juhtudel ≥ 95%, välja arvatud PPA osas (90%), mis oli tingitud avastatud L858R mutatsioonide väikesest arvust.

Tab. 15 cobas EGFR testi ja NGS-i võrdlus EGFR-i 19. eksoni deletsioonide ja L858R mutatsiooni avastamisel

Mutatsioon	Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
19. eksoni deletsioon	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	95,9% (94/98)	90,0%, 98,4%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	99,7% (309/310)	98,2%, 99,9%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	98,8% (403/408)	97,2%, 99,5%
L858R	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	90,6% (48/53)	79,7%, 95,9%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	98,6% (350/355)	96,7%, 99,4%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	97,5% (398/408)	95,5%, 98,7%
Kokkuvõttlikult	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	94,0% (142/151)	89,1%, 96,8%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	97,7% (251/257)	95,0%, 98,9%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	96,3% (393/408)	94,0%, 97,8%

Korrelatsioon standardmeetodiga AURA2 uuringu II faasi proovide kasutamisel

cobas EGFR testi kliinilise toimivuse hindamiseks võrreldi seda valideeritud järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodiga (NGS). Kasutati 383 formaliinis fikseeritud ja parafineeritud kopsuvähi kasvaja proovi, mis pärinesid AURA2 TAGRISSO® (osimertiniib) uuringu II faasi kaugale arenenud NSCLC-kasvajaga patsientidelt, kes sõeluti **cobas** EGFR Testi kasutades.

cobas EGFR testi kasutades uuriti kokku 472 AURA2 uuringu patsienti. Pärast mittekõlblike patsientide väljajätmist olid selle uuringu jaoks kõlblikud 383 patsienti.

Kõiki 383 proovi testiti pimemeetodil nii **cobas** EGFR testi kui ka valideeritud NGS meetodiga. Neist 368 proovi tulemused olid kehtivad nii **cobas** EGFR testi kui ka NGS-iga. Kokku 2 juhul täheldati kehtetut tulemust nii **cobas** EGFR testi ja NGS-iga, 2 juhul ainult NGS-iga ja 11 juhul ainult **cobas** EGFR testiga. **cobas** EGFR testi analüütilise täpsuse analüüsimiseks võrreldes NGS võrdlusmeetodiga hinnati T790M mutatsioonide positiivsete tulemuste protsentuaalset kokkulangevust (PPA), negatiivsete tulemuste protsentuaalset kokkulangevust (NPA) ja üldist protsentuaalset kokkulangevust (OPA) ning nende vastavaid 95% usaldusvahemikke.

AURA2 uuringus **cobas** EGFR testiga tuvastatud EGFR geeni mutatsioonid on esitatud vastavalt (vt Tab. 16). AURA2 kohordis avastatud mutatsioonide puhul on analüütiline tundlikkus tõendatud eespool loetletud mutatsioonide näitel (vt Tab. 6).

Tab. 16 cobas EGFR testiga AURA2 kohordis tuvastatud mutatsioonid

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

Kokkulangevusanalüüs hõlmas kokku 368 proovi, mis andsid kehtivad tulemused nii **cobas** EGFR testi kui ka NGS-i sekveneerimisega. PPA **cobas** EGFR testi ja NGS-i vahel oli 88,3% (95% CI: 83,8–91,7%), NPA oli 97,3% (95% CI: 92,4–99,1%) ja OPA 91,0% (95% CI: 87,7 kuni 93,5%) T790M mutatsiooni tuvastamisel, vt Tab. 17. Kolmkümmend proovi olid NGS-i analüüsil positiivsed, kuid negatiivsed **cobas** EGFR testi alusel. Vastavalt 10/30 proovi puhul oli NGS-iga määratud T790M mutatsiooni esinemisprotsent alla **cobas** EGFR testi tuvastamiskiiri (LoD) (< 2% mutatsioon). 20/30-proovi puhul viitas mõõdukalt viibinud IC Ct väärtus DNA raskele amplifitseeritavusele.

Tab. 17 **cobas** EGFR testi ja NGS-i võrdlus EGFR T790M mutatsiooni tuvastamisel

Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	88,3% (226/256)	83,8%, 91,7%
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	97,3% (109/112)	92,4%, 99,1%
Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	91,0% (335/368)	87,7%, 93,5%

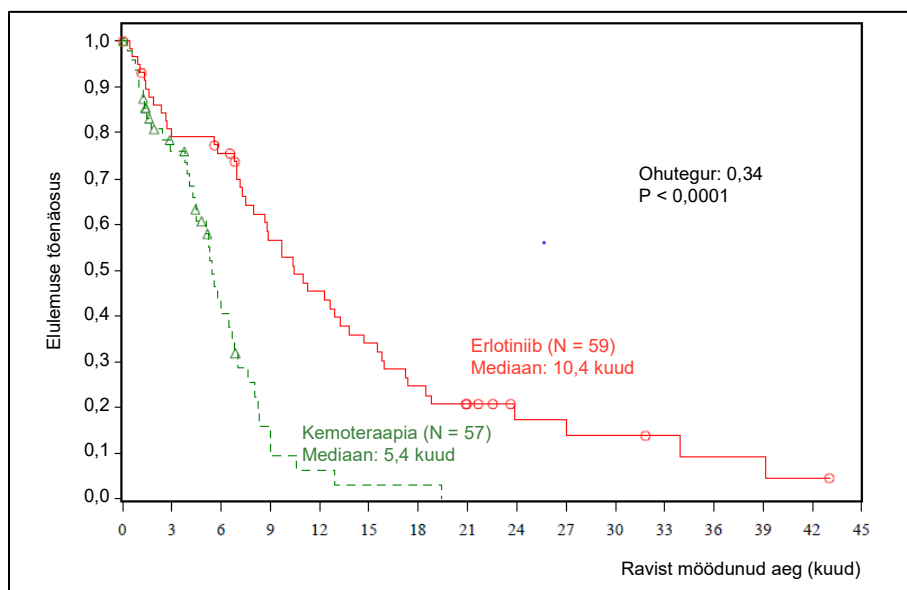
Kliinilise käigu andmed

EURTAC

EURTAC-i uuring²² oli mitmes uurimiskeskuses läbiviidud III faasi avatud, randomiseeritud võrdlusuuring ravimi TARCEVA® (erlotiniib) ja standardse plaatinadubletiga kemoterapia kohta esimese rea ravina, kemoterapiat mitte saanud kaugele arenenud NSCLC-kasvajaga patsientide osas, kelle kasvajad sisaldavad kliinilise uuringu katsete (CTA) põhjal EGFR-i 19. eksoni deletsioone või 21. eksoni (L858R) asendusmutatsioone. Uuring läbiviimist spondeeris Spanish Lung Cancer Group (SLCG). Uuringusse kaasati kokku 174 patsienti. Uuringu tulemused näitasid, et patsientidel, kes said ravimit TARCEVA®, oli võrreldes kemoterapiat saanud patsientidega statistiliselt märkimisväärselt suurem progressioonivaba elulemus (PFS) (mediaanne PFS 10,4 kuud, võrreldes 5,1 kuuga) ja ohusuhe (HR) 0,34 ($p < 0,0001$, 95% CI [0,23; 0,49]). TARCEVA® haru patsientide ravivastus oli suurem kui kemoterapiaravi saanud patsientidel (vastavalt 65,1% ja 16,1%). Üldise elulemuse (OS) osas ei täheldatud nendes kahes harus märkimisväärselt erinevust, sest 76% tavapärast kemoterapiaravi saanud patsientidest läksid üle TARCEVA® ravile.

EURTAC-i uuringus osalenud 174 patsiendist olid uuesti testimiseks saadaval 134 juhtumit (77% uuringu populatsioonist, sealhulgas 69 patsienti TARCEVA® harust ja 65 patsienti kemoterapia harust) ning neid testiti retrospektiivselt **cobas** EGFR-testiga. **cobas** EGFR-testiga uuesti testitud 134 juhtumist saadi **cobas** EGFR-testiga 116 juhul (59 patsienti TARCEVA® harust ja 57 patsienti kemoterapia harust) tulemus „Mutation Detected”. Selle 116-liikmelise alamrühma analüüsimisel selgus, et TARCEVA® ravi saanud patsientidel oli märkimisväärselt pikem progressioonivaba elulemus (PFS) (mediaanne PFS vastavalt 10,4 ja 5,4 kuud) ning väiksem progresseeruva haiguse väljaarenemise või surma tõenäosus (ohutegur = 0,34, 95% CI [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) kui kemoterapiat saanud patsientidel (Joonis 3). TARCEVA® haru ravivastus oli võrreldes kemoterapia haruga suurem (vastavalt 59,3% ja 14,0%). Üldise elulemuse osas nende kahe rühma vahel märkimisväärselt erinevust ei täheldatud. **cobas** EGFR testiga testitud patsientide alamrühmas täheldatud kliiniline eelis oli võrreldav uuringu kogupopulatsiooni vastava näitajaga (Tab. 18).

Tehti täiendav tõhususanalüüs patsientide kohta, kelle puhul **cobas** EGFR test andis positiivse tulemuse, kuid CTA negatiivse või kehtetu tulemuse. Kõige halvema stsenaariumi korral (eeldades, et **cobas** EGFR testi järgi positiivsete ja CTA järgi negatiivsete patsientide ohutegur on 1) näitasid andmed ohutegurit 0,42 (95% CI [0,26; 0,57]).

Joonis 3 Progressioonivaba elumuse Kaplan-Meieri graafik vastavalt ravile patsientide kohta, kelle puhul cobas EGFR test andis tulemuse „Mutation Detected” (uurijahinnang)**Tab. 18** cobas EGFR testiga testitud patsientide kliiniline eelis on võrreldav EURTAC-i populatsioonis täheldatud vastava näitajaga

Parameeter	cobas EGFR-testi positiivne populatsioon n = 116		EURTAC n = 173*	
	Kemoteraapia n = 57	Erlotiniib n = 59	Kemoteraapia n = 87	Erlotiniib n = 86
PFS				
Mediaan (kuud)	5,4	10,4	5,1	10,4
Riskisuhe	0,34		0,34	
Riskisuhe 95% CI	(0,21; 0,54)		(0,23; 0,49)	
P-väärtus (logrank-test)	< 0,0001		< 0,0001	

* Üks patsient võttis pärast EURTAC-i uuringu lõpulejõudmist oma nõusoleku tagasi, mistõttu andmekogum oli n = 173.

AURA2

AURA2 oli²³ mitmes uurimiskeskuses läbi viidud II faasi avatud, ühegrupiline uuring, hindamaks ravimi TAGRISSO® (osimertiniib) ohutust ja tõhusust teise või $\geq$ kolmanda ravivalikuna kaugelearenenud NSCLC patsientidel, kelle kasvaja oli progresseerunud pärast ravi heakskiidetud EGFR TKI preparaadiga. Kõikidel patsientidel pidi olema **cobas** EGFR testi alusel T790M mutatsiooniga NSCLC kasvaja. Esmane tõhususe lõpp-punkti tunnus oli objektiivne vastusmäär (ORR – objective response rate) vastavalt RECIST 1.1-le, mida hinnati sõltumatu keskse pimedäbivaatuse tulemustega (BICR), kasutades vastuse analüüsikomplekti hindamist. ORR määratleti kui 1 arstivisiidi teinud ja täisvastuse (CR) või osalise vastuse (PR) andnud patsientide arv (%), mis kinnitati vähemalt 4 nädalat hiljem (st kui CR-i või PR-i parim objektiivne vastus [BOR]).

AURA2 uuringu sõelutud 472-st patsiendist olid 383 kõlbulikud **cobas** EGFR testimiseks. Nendest 233-st sobilikust patsientidest haarati 210 T790M+ AURA2 uuringusse ja nad said ravimit TAGRISSO® (full analysis set [FAS] – täielik analüüside komplekt).

Tab. 19 allpool on esitatud ORR tulemused BICR-i järgi vastavalt uurijahinnangule AURA2 uuringus. Vähemalt ühe annuse ravimit TAGRISSO® (FAS) saanud 210-st patsiendist ilmnes BICR-iga kinnitatud ravivastus 128 patsiendil, ORR-iga 61,0% (95% CI: 54,0–67,6%) ja 135 patsiendil uurijahinnanguga ORR-iga 64,3% (95% CI: 57,4–70,8%).

Kõiki 383 AURA2 uuringuks kõlblikke patsiente testiti uuesti **cobas** EGFR-testiga. AURA2 uuringusse kaasatud 233-st T790M patsiendist 225 olid **cobas** EGFR Test alusel T790+ ja 204 olid FAS-is.

Vähemalt ühe annuse ravimit TAGRISSO® (FAS) saanud 204-st patsiendist ilmnes ravivastus BICR-iga kinnitatud ravivastus 127 patsiendil, ORR-iga 62,3% (95% CI: 55,2–68,9%) ja 133 patsiendil uurijahinnanguga ja ORR-iga 65,2% (95% CI: 58,2–71,7%).

Tab. 19 cobas EGFR testiga testitud T790M+ AURA2 patsientide kliiniline eelis

		AURA2			cobas EGFR test (IVD) T790M positiivne		
Analüüsi komplekt	Hinnatud	N	Kinnitatud ravivastusega patsientide arv	ORR (95% CI)	N	Kinnitatud ravivastusega patsientide arv	ORR (95% CI)
Täielik analüüside komplekt	Pimendatud läbivaatuse tulemused	210	128	61,0% (54,0%, 67,6%)	204	127	62,3% (55,2%, 68,9%)
	Uurija		135	64,3% (57,4%, 70,8%)		133	65,2% (58,2%, 71,7%)

FLAURA

I. TAGRISSO® esmase rea III faasi uuring

FLAURA uuring¹⁰ oli III faasi topeltpime randomiseeritud kliiniline uuring hindamaks TAGRISSO® efektiivsust ja ohutust võrreldes tavaraviga (tavaravi: EGFR-TKI [kas gefitiniib või erlotiniib]) esmase valiku ravina lokaalselt kaugelearenenud või metastaatilise NSCLC-ga patsientidel, kes ei saanud varem süsteemset ravi kaugelearenenud haiguse raviks ning kelle kasvaja olid lokaalselt või tsentraalselt kinnitatud EGFR-tundlikkusmutatsioonidega, Ex19del- või L858R-asendusmutatsioonidega (kokkuvõtlikult EGFRm-positiivsed). FLAURA uuringu põhitulemusnäitaja oli progressioonivaba elumüs (PFS), mis põhines uurija hinnangul patsientidele täisanalüüsi rühmas (FAS: kõik globaalselt randomiseeritud patsiendid).

Uuringus randomiseerimiseks skriiniti kokku 994 patsienti, kellest 809-l testiti kasvajakoeproove tsentraalse **cobas** EGFR-testiga kas prospektiivselt skriinimisel või retrospektiivselt. Tsentraalne **cobas** EGFRm-positiivne testitulemus saadi 500 patsiendil 556 randomiseeritud patsiendist (289 randomiseeriti tsentraalse **cobas** koetestiga ja 267 randomiseeriti lokaalse testiga). Lokaalse testiga randomiseeritud 267 patsiendist 211-l kinnitati tsentraalne **cobas** EGFRm-positiivne testitulemus, 41 patsiendil ei saadud **cobas** testitulemust proovi puudumise / inadekvaatse proovi tõttu, 9 patsiendil olid testiga **cobas** kehtetud tulemused ja 6 patsiendil oli **cobas** testitulemus „Mutatsiooni ei tuvastatud”.

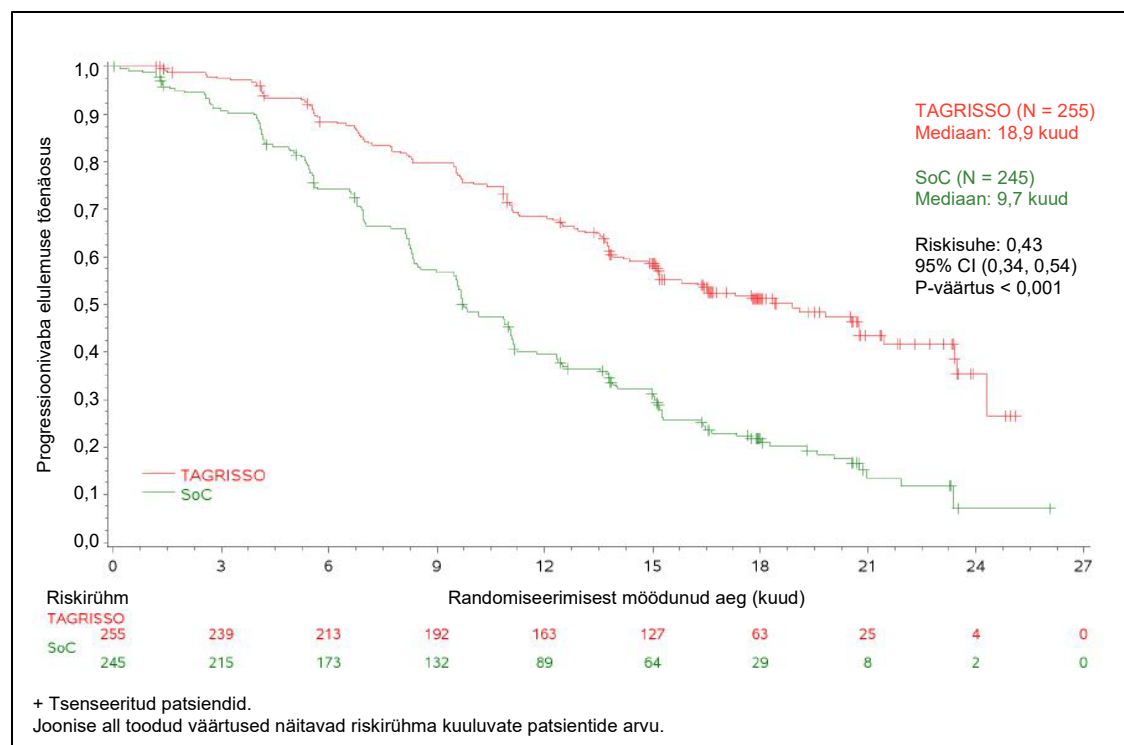
Tab. 20all on toodud uurija hinnangul PFS-i HR kogu analüüsi rühmale ja primaarsele seadmepopulatsioonile (patsientidel, kellel oli tsentraalne **cobas**-koe EGFRm-positiivne tulemus). Kogu analüüsi rühma (N = 556) uurija hinnangulise PFS-i HR stratifitseeritud log-rank-testi alusel oli 0,46 (95% CI: 0,37, 0,57). Sama punkti hinnang saadi kohandamata Coxi proportsionaalsete ohtude mudelist. Primaarse seadmepopulatsiooni (N = 500) uurija hinnangulise PFS-i HR kohandamata Coxi proportsionaalsete ohtude mudeli alusel oli 0,43 (95% CI: 0,34, 0,54). Primaarse seadmepopulatsioonis täheldatud kliiniline tõhusus sobitus täielikus analüüsi rühmas saaduga. Uurija hinnangulise PFS-i Kaplan-Meieri kõver primaarse seadmepopulatsioonis on toodud Joonis 4.

Tab. 20 FLAURA täisanalüüsi rühma ja primaarse seadmepopulatsiooni (cobas EGFR testiga positiivne) uurija hinnanguline progressioonivaba elulemus

	FLAURA täisanalüüsikomplekt N = 556		FLAURA cobas EGFR-testi positiivne populatsioon (primaarne seadmepopulatsioon) N = 500	
	Osimertiniib (N = 279)	Gefitiniib või erlotiniib (N = 277)	Osimertiniib (N = 255)	Gefitiniib või erlotiniib (N = 245)
PFS				
Juhtude arv (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Mediaan-PFS kuudes (95% CI)	18,9 (15,2, 21,4)	10,2 (9,6, 11,1)	18,9 (15,2, 21,4)	9,7 (9,5, 11,0)
Riskisuhe (95% CI) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
2-poolne p-väärtus ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a Kohandamata Coxi proportsionaalne ohtude mudel

Joonis 4 Progressioonivaba elulemuse Kaplan-Meieri graafik olenevalt ravist patsientide kohta, kelle puhul cobas EGFR-test andis FLAURA uuringus tulemuse „Mutation Detected” (uurijahinnang)



II. IRESSA® tavaravi analüüs

FLAURA uuringu kontrollrühmas tehti tEGFR+-patsientidega, keda raviti IRESSA®-ga (gefitiinib), eraldusanalüüs. IRESSA®-ravi saanud 178 patsiendist esines 174-l uurija-hinnatud objektiivne ravivastus [ORR = 67,8% (118/174, 95% CI: 60,6%, 74,3%, POP0 Tab. 21)].

IRESSA®-ravi saanud ja tsentraalse cobas-koetestiga randomiseeritud 79 patsiendist (primaarne efektiivsuspopulatsioon) esines 57-l objektiivne ravivastus, kui ORR oli 72,2% (95% CI: 61,4%, 80,8%, POP1 Tab. 21).

IRESSA®-ravi mõju tagati olenevalt cobas-koetestist teistes patsiendipopulatsioonides, kus ORR-id olid 64,2% (POP2, lokaalseks testiks võetud cobas tEGFR+-patsiendid) kuni 68,5% (POP3, kõik cobas tEGFR+-patsiendid) (Tab. 21 ja Joonis 5). Need tulemused vastavad algses registreeritud uuringus (IFUM) toodud tulemustele patsientide puhul, kes valiti saama IRESSA®-ravi.¹³

Tab. 21 Erinevate patsiendipopulatsioonide ORR-tulemused olenevalt cobas EGFR-i koetestist

Objektiivne ravivastus	Randomiseeritud patsiendid tavaravi rühmas, keda raviti IRESSA®-ga				
	Tsentraalselt randomiseeritud (cobas tEGFR+)	Lokaalselt randomiseeritud (lokaalne tEGFR+)			Kokku
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Kehtetu/teadmata	
Patsientide arv	79	70	2	23	174
Vastus	57	45	1	15	118
Vastus puudub	22	25	1	8	56
ORR (% , 95% CI)	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%)		-	-	-

Märkus. Puuduva objektiivse ravivastusega patsiendid jäeti välja.

Märkus. tEGFR = koe EGFR; CI =(skoor) usaldusvahemik.

POP = populatsioon (alagrupp)

POP1: cobas-koetestiga randomiseeritud patsientide ORR (primaarne efektiivsuspopulatsioon cobas-koetestiga).

POP2: lokaalse koetestiga randomiseeritud patsientide ORR.

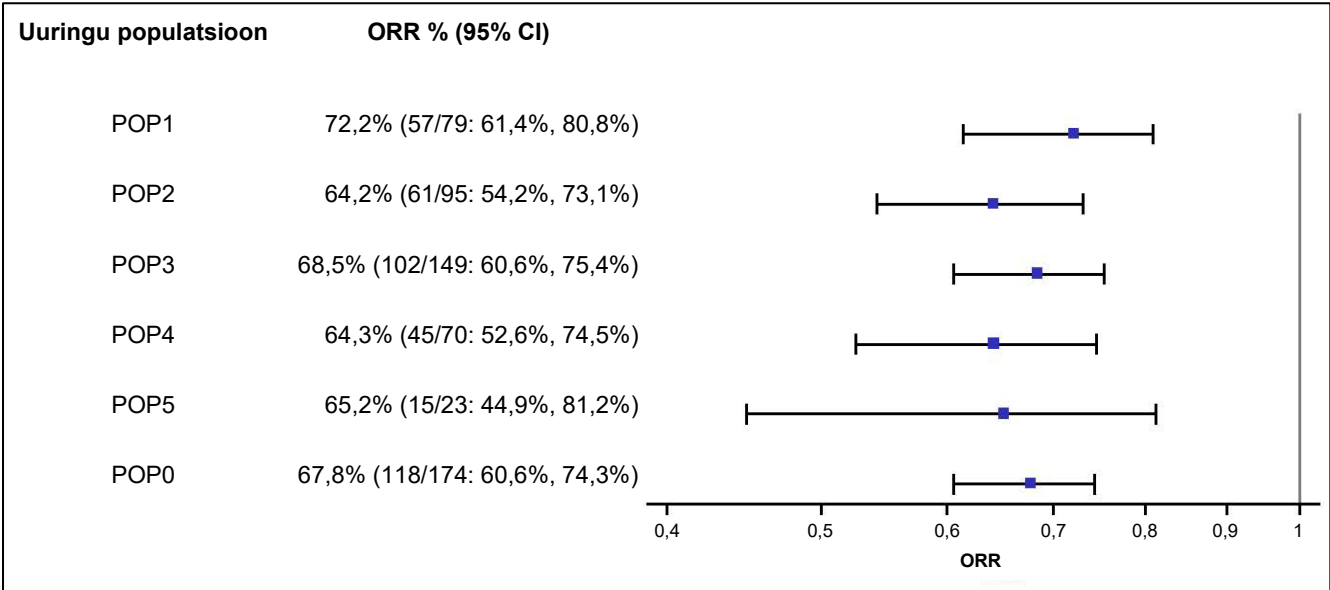
POP3: positiivse cobas-koetestiga randomiseeritud patsientide ORR.

POP4: lokaalse koetestiga randomiseeritud ja cobas-koetestiga kinnitatud patsientide ORR.

POP5: lokaalse koetestiga randomiseeritud kehtetu cobas-koetestiga või sellega mitte testitud patsientide ORR.

POP0: kõikide IRESSA®-ga ravitud patsientide ORR.

Joonis 5 Foresti graafikud ORR-ides, põhinedes cobas EGFR-i koetesti erinevates populatsioonides



POP = populatsioon (alagrupp)
POP1: **cobas**-koetestiga randomiseeritud patsientide ORR (primaarne efektiivsuspopulatsioon **cobas**-koetestiga).
POP2: lokaalse koetestiga randomiseeritud patsientide ORR.
POP3: positiivse **cobas**-koetestiga randomiseeritud patsientide ORR.
POP4: lokaalse koetestiga randomiseeritud ja **cobas**-koetestiga kinnitatud patsientide ORR.
POP5: lokaalse koetestiga randomiseeritud kehtetu **cobas**-koetestiga või sellega mitte testitud patsientide ORR.
POP0: kõikide IRESSA®-ga ravitud patsientide ORR.

JAOTIS B: KASUTAMINE PLASMAPROOVIDEGA

Proovi ettevalmistamine

DNA eraldamise kohta plasmaproovidest vaadake komplekti **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

Materjalid ja reaktiivid

Komplekti kuuluvad materjalid ja reaktiivid

Komplekt/kassetid	Komponendid ja reaktiivi toimeained	Kogus ühes testis	Ohutussümbol ja hoiatus
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 testi (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR põhisegu 1) (M/N: 06471366001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA
	EGFR MMX-2 (EGFR põhisegu 2) (M/N: 06471382001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA

Komplekt/kassetid	Komponendid ja reaktiivi toimeained	Kogus ühes testis	Ohutussümbol ja hoiatus
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 testi (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR põhisegu 3) (M/N: 07248601001) Tris-puhver Kaaliumkloriid Glütserool EDTA Tween 20 3,13% dimetüülsulfoksiidi 0,09% naatriumasiid < 0,10% dNTP-sid < 0,01% Z05 AS1 DNA polümeraasi (mikroobne) < 0,01% AmpErase-ensüümi (uratsiil-N-glükosülaas) (mikroobne) < 0,01% aptameeri < 0,01% päri- ja pöördsuunalised EGFR praimereid < 0,01% fluorestsentsmärgisega EGFR-sonde	2 × 0,48 ml	NA
	MGAC (Magneesiumatsetaat) (M/N: 05854326001) Magneesiumatsetaat 0,09% naatriumasiid	6 × 0,2 ml	NA
	EGFR MC (EGFR mutatsioonikontroll) (M/N: 06471455001) Tris-puhver EDTA Poly rA RNA (süntetiline) 0,05% naatriumasiid < 0,1% plasmiidset DNA-d, mis sisaldab EGFR-i eksoni 18, 19, 20 ja 21 järjestusi (mikroobne) < 0,1% EGFR-i „looduslik” DNA (rakukultuur)	6 × 0,1 ml	NA
	DNA SD (DNA-proovi lahusti) (M/N: 05854474001) Tris-HCl puhver 0,09% naatriumasiid	2 × 3,5 ml	NA

Reaktiivide säilitamine ja käitlemine

Reaktiiv	Säilitamistemperatuur	Säilitamisaeg
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2...8 °C	Pärast avamist püsivad stabiilsena 4 kasutuskorda (90 päeva jooksul) või kuni aegumistähtajani, kui see saabub varem.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** ja tööpõhisegu (valmistatud reaktiivi **MGAC** lisamisega reaktiivile **EGFR MMX-1** või reaktiivile **EGFR MMX-2** või reaktiivile **EGFR MMX-3 v2**) tuleb kaitsta pikaajalise kokkupuute eest valgusega. Tööpõhisegu tuleb säilitada pimedas, temperatuuril 2...8 °C. Ettevalmistatud proovid ja kontrollproovid tuleb lisada 1 tunni jooksul alates tööpõhisegu valmistamisest. Amplifikatsiooniga tuleb alustada 1 tunni jooksul alates töödeldud proovide ja kontrollproovide lisamisest tööpõhisegule.

Täiendavad vajalikud materjalid

Materjalid	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Valgendaja	Iga tarnija
70%-line etanool	Iga tarnija
Steriilsed, ühekordselt kasutatavad seroloogilised pipetid (5 ja 25 ml)	Iga tarnija
cobas® 4800 süsteemi mikrotiiterplaat (AD-plaat) ja kattekile	Roche 05232724001
cobas® 4800 süsteemi kattekile aplikaator (tarnitakse cobas® 4800 süsteemi paigaldamisel)	Roche 04900383001
Reguleeritavad pipetid* (mahuga 5–1 000 µl)	Iga tarnija
Aerosoolitõkkega varustatud või DNAasi-vabad kolbotsikud pipeteerijale	Iga tarnija
Laua-mikrotsentrifuug* (võimsusega 20 000 × g)	Eppendorfi mudel 5430 või 5430R või samaväärne
Külmik säilitustemperatuuriga –25...–15 °C	Iga tarnija
Lukustuva kaanega mikrotsentrifuugi katsutid (1,5 ml, RNAasi-/DNAasi-vaba, PCR grade)	Iga tarnija
Katsutirestid koonilistele katsutitele ja mikrotsentrifuugi katsutitele	Iga tarnija
Vortex-segisti*	Iga tarnija
Ühekordselt kasutatavad talgivabad kindad	Iga tarnija

* Kõiki seadmeid tuleb hoida korras vastavalt tootja juhiste.

Täiendavat teavet eraldi müüdavate materjalide kohta küsige kohalikult Roche esindajalt.

Vajalikud seadmed ja tarkvara, mida kaasas ei ole

Vajalikud seadmed ja tarkvara, ei ole kaasas
Analüsaator cobas® z 480
Süsteemi cobas® 4800 juhtimisseade, mille tarkvaraversioon on 2.2 või uuem
EGFR-i plasmaanalüüsipakett P1, tarkvaraversioon 1.0 või uuem*
Väline USB-võõtkoodilugeja
Printer

* Praeguse tarkvaraversiooni jaoks vaadake **cobas®** EGFR Mutation Test v2 komplekti toote infolehte (M/N: 07335873001).

Lisateavet eraldi müüdavate materjalide kohta küsige kohalikult Roche'i esindajalt.

Ettevaatusabinõud ja käitlemise nõuded

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Nagu kõigi testiprotseduuride puhul, on selle analüüsi toimimise eelduseks hea laboritava.

- Kasutamiseks ainult *in vitro* diagnostikas
- Ohutuskaardid (SDS) on saadaval kohalikus Roche esinduses.
- Test on ette nähtud kasutamiseks NSCLC-plasmaproovidega. Proove tuleb käsitada nakkusohtlikena, rakendades väljaandes Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ ja CLSI dokumendis M29-A4 kirjeldatud laboriohutuseeskirju.¹⁷
- Soovitav on kasutada ühekordselt kasutatavaid pipette ja DNaasi-vabu pipetiotsikuid.

Hea laboritava

- Suu abil mitte pipeteerida.
- Ärge sööge, jooge ega suitsetage laboris.
- Pärast proovide ja komplektireaktiivide käsitlemist tuleb hoolikalt käsi pesta.
- Mis tahes reaktiivide käsitlemisel tuleb kanda kaitseprille, laborikitlit ja ühekordselt kasutatavaid kindaid. Vältige materjalide kokkupuudet naha, silmade ja limaskestadega. Kokkupuute korral tuleb kokkupuutekohta kohe rohke veega pesta. Vastasel korral võivad tekkida põletushaavad. Mahavoolamise korral tuleb mahavoolanud kogus enne ärakuivatamist veega lahjendada.
- Kõik labori tööpinnad tuleb põhjalikult puhastada ja desinfitseerida destilleeritud või deioniseeritud vees värskelt valmistatud 0,5% naatriumhüpokloriti lahusega (lahjendada olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10). Seejärel tuleb pind üle pühkida 70%-lise etanooliga.

Märkus. Müügil olevad olmepleegitusvedelikud sisaldavad üldjuhul 5,25% naatriumhüpokloritit. Lahjendades olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10, saadakse naatriumhüpokloriti 0,5% lahus.

Saastumine

- Proovide ja cobas EGFR testi reaktiivide käsitlemisel tuleb saastumise vältimiseks kanda kindaid. Proovide käsitlemisel tuleb vältida kinnaste saastumist.
- Kinnaste saastumise võimalikkuse vähendamiseks tuleb kindaid sageli vahetada.
- Kindaid tuleb vahetada enne DNA eraldamise aladest lahkumist või kui on alust kahtlustada kokkupuutumist lahuse või prooviga.
- Vältige reaktiivide saastumist mikroobide ja ribonukleasmateljaliga.
- Amplifitseerimise ja tuvastamise tööala tuleb enne tööpõhisegu ettevalmistamist põhjalikult puhastada. Iga operatsiooni jaoks tuleb kasutada eraldi varusid ja seadmeid, mida ei tohi kasutada muude operatsioonide jaoks ega viia muudesse tööpiirkondadesse. Näiteks ei tohi DNA eraldamiseks mõeldud pipette ja varusid kasutada amplifitseerimiseks ja tuvastamiseks ette nähtud reaktiivide ettevalmistamiseks.
- Soovitav on korraldada labori tööprotsessid ühesuunaliselt, lõpetades ühe tegevuse enne järgmise juurde asumist. Näiteks DNA eraldamine tuleb teostada enne amplifitseerimise ja tuvastamise alustamist. DNA eraldamine tuleb teostada alal, mis on eraldatud alast, kus toimub amplifitseerimine ja tuvastamine. Tööpõhisegu saastumise vältimiseks DNA-proovidega, tuleb amplifitseerimise ja tuvastamise ala enne tööpõhisegu valmistamist põhjalikult puhastada.

Terviklikkus

- Ärge kasutage komplekte pärast kõlblikkusaja lõppu.
- Ärge segage kokku eri komplektidest või partiidest pärit reaktiive.
- Ärge kasutage ühekordselt kasutatavaid esemeid pärast nende aegumistähtaega.
- Kõik ühekordselt kasutatavad esemed on mõeldud ühekordseks kasutamiseks. Mitte kasutada korduvalt!
- Kõiki seadmeid tuleb hoida nõuetekohases korras vastavalt tootja juhistele.

Utiliseerimine

- **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC ja DNA SD** sisaldavad naatriumasiidi. Naatriumasiid võib reageerida pliist ja vasest äravoolutorudega, moodustades ülimalt plahvatusohtlikke metalliasiide. Naatriumasiidi sisaldavate lahuste labori kraanikausist allavalamise korral tuleb asiidi kogunemise vältimiseks torusid uhtuda suure koguse külma veega.
- Kasutamata reaktiivid ja jäägid tuleb kõrvaldada kooskõlas föderaalsete, riiklike ja kohalike nõuetega.

Mahavoolamine ja puhastamine

- Kui instrumendile **cobas® 4800** satub pritsmeid, järgige puhastamiseks asjakohase süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatu või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabi juhiseid.
- Ärge kasutage analüsaatori **cobas® z 480** puhastamiseks naatriumhüpokloritilahust (pleegitusvedelikku). Järgige analüsaatori **cobas® z 480** puhastamisel asjakohase süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatu või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabis kirjeldatud toiminguid.
- Lisahoiatused, ettevaatusabinõud ja toimingud analüsaatori **cobas® z 480** saastumisohu vähendamiseks leiate süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist.

Proovide võtmine, transportimine ja säilitamine

Märkus. Kõiki proove tuleb käsitada potentsiaalselt nakkusohtlikena.

Proovide võtmine ja käitlemine

Roche Cell-Free DNA Collection Tube

Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (Roche cfDNA katsutitesse) kogutud täisvere plasma on valideeritud kasutamiseks **cobas** EGFR-testiga.

Roche cfDNA katsutisse kogutud verest tuleb eraldada plasma 7 päeva jooksul alates kogumisest. Roche cfDNA katsutisse kogutud vereproovid on stabiilsed 7 päeva, kui neid säilitatakse või transporditakse temperatuurivahemikus 15–25 °C siirdeajaga kuni 16 tundi temperatuurivahemikus 15–30 °C. Pärast plasma eraldamist säilitage, nagu on näidatud allolevas jaotises **Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus**.

Märkus. Roche cfDNA katsutisse kogutud verest eraldatud plasmas on täheldatud hemolüüsi. Siiski on näidatud, et hemoglobiini kontsentratsioonid $\leq 2,0$ g/l ei mõjuta **cobas** EGFR-testi toimivust.

K2 EDTA kogumiskatsuti

K2 EDTA katsutitesse kogutud täisvere plasma on valideeritud kasutamiseks **cobas** EGFR-testiga.

K2 EDTA täisverd võib säilitada kuni 8 tundi temperatuuril $\leq 30\text{ °C}$. Pärast plasma eraldamist säilitage nii, nagu on näidatud allolevas jaotises **Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus**.

Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus

Plasmaproovide transportimisel tuleb järgida föderaalset, riiklikke ja kohalikke nakkusohvtlike materjalide transpordi nõudeid.¹⁸

Plasmaproovid on stabiilsed järgmiste puhul:

Plasmaproovide säilitamistemperatuur	$\leq -70\text{ °C}$	$-15\text{...}-25\text{ °C}$	$2\text{...}8\text{ °C}$	$15\text{...}30\text{ °C}$
Roche cfDNA plasma säilitusaeg	Kuni 30 päeva	Kuni 30 päeva	Kuni 7 päeva	Kuni 1 päev
K2 EDTA plasma säilitusaeg	Kuni 12 kuud	Kuni 12 kuud	Kuni 3 päeva	Kuni 1 päev

Töödeldud proovide säilitamine ja stabiilsus

Roche cfDNA või K2 EDTA katsutist saadud plasma töödeldud proov (eraldatud cfDNA) on stabiilne ühe jaoks järgnevatest:

Ekstraheeritud cfDNA säilitamistemperatuur	$-15\text{...}-25\text{ °C}$	$2\text{...}8\text{ °C}$	$15\text{...}30\text{ °C}$
Säilitamisaeg	Külmutatud ja sulatatud kuni 2 korda 60 päeva jooksul	Kuni 21 päeva	Kuni 7 päeva

Eraldatud cfDNA tuleb kasutada ära soovitusliku säilitusaja jooksul või enne DNA eraldamiseks kasutatud komplekti **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit aegumistähtaega, kui see saabub varem.

Enne ekstraheeritud ja säilitatud DNA põhimaterjali kasutamist segage pulseerivalt ja tsentrifuugige põhimaterjali sisaldavat elutsioonikatsutit.

Testiprotseduur

Testi teostamine

Joonis 6 cobas EGFR testi tööprotsess cobas® cfDNA Sample Preparation Kitiga

1	Käivitage süsteem
2	Tehke instrumentide hooldus
3	Võtke säilituskohast proovid ja reaktiivid
4	Valmistage proovid veeruga sidumiseks
5	Eraldage DNA
6	Elueerige DNA
7	Looge Work Order ja printige plaadi paigutus
8	Valmistage amplifikatsiooni reaktiivid
9	Pange amplifikatsiooni reaktiivid AD-plaadile
10	Pange proov AD-plaadile
11	Sulgege AD-plaat
12	Pange AD-plaat analüsaatorisse cobas® z 480
13	Käivitage tööseeria
14	Vaadake tulemused üle
15	LIS-i kasutades: saatke tulemus LIS-i
16	Võtke materjalid analüsaatorist välja

Kasutusjuhised

Märkus. Ainult Roche cfDNA katsutisse või K2 EDTA katsutisse kogutud verest eraldatud plasma on valideeritud kasutamiseks **cobas EGFR-testiga**.

Märkus. Analüsaatori **cobas® z 480** kasutusjuhised leiate analüsaatori **cobas® z 480** kasutusjuhendist.

Tööseeria maht

Üks tööseeria võib hõlmata 1–30 proovi (lisaks kontrollproovid) 96 auguga AD-plaadi kohta. Kui tööseerias on üle 24 proovi, tuleb kasutada mitut **cobas EGFR** testi komplekti.

cobas EGFR-testikomplekt sisaldab piisavalt reaktiive 8 tööseeria jaoks, milles igaühes on 3 proovi (lisaks kontrollproovid). Seega saab ühe komplektiga testida kuni 24 proovi.

Tervikliku protsessi kontroll

Selleks testiks on vaja tervikliku protsessi negatiivset kontrolli. Töödelge igas katseseerias negatiivset kontrolli samal ajal proovi(de)ga DNA eraldamise toimingust alates.

DNA eraldamine

DNA eraldatakse plasmaproovidest komplekti **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) kasutades.

Amplifikatsioon ja tuvastamine

Märkus. Tööpõhise saastumise vältimiseks DNA-proovidega tuleb amplifitseerimist ja tuvastamist teha DNA eraldamisest eraldi alal. Amplifitseerimise ja määramise tööala tuleb enne tööpõhise ettevalmistamist põhjalikult puhastada. Õigeks puhastamiseks tuleb kõiki pindu (sh reste ja pipeteerijaid) põhjalikult puhastada 0,5% naatriumhüpokloritilahusega ja seejärel 70% etanoolilahusega. Müügil olevad olmepleegitusvedelikud sisaldavad üldjuhul 5,25% naatriumhüpokloriti. Lahjendades olmepleegitusvedelikku vahekorras 1:10, saadakse naatriumhüpokloriti 0,5% lahus.

Instrumendi seadistamine

Analüsaatori cobas® z 480 üksikasjalikke kasutusjuhiseid vt süsteemi cobas® 4800 kasutaja käsiraamatust või süsteemi cobas® 4800 kasutajaabist.

Testi tellimuste seadistamine

Üksikasjalikke juhiseid EGFR-töövooetappide kohta vt süsteemi cobas® 4800 kasutaja käsiraamatust või süsteemi cobas® 4800 kasutajaabist.

Koostage plaadikaart kõikide selle tööseeria proovide ja kontrollproovidega. Lisage ainult plasmaproove sisaldavasse seeriasse mutatsiooni kontrollproov plaadile aukudesse A01–A03. Lisage negatiivne kontrollproov plaadile aukudesse B01–B03. Seejärel lisage proovid 3 kaupa veergudesse, alates C01–C03 kuni H10–H12, vt Joonis 7.

Testi cobas EGFR saab kasutada segatestimisrežiimis (nt EGFR-kude EGFR-plasmaga). Kontrollpositsioonid võivad erineda, olenevalt valitud testidest ja proovide arvust. Rohkem teavet segatestiseeria seadistamiseks vaadake testi cobas® EGFR Mutation v2 tarkvara kasutaja käsiraamatust või süsteemi cobas® 4800 kasutaja käsiraamatust või süsteemi cobas® 4800 kasutajaabist.

Joonis 7 cobas EGFR testi asetuse plaadil

Rida / veerg	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

Seletus: MC = mutatsiooni kontrollproov, NEG = negatiivne kontrollproov, S# = proovi ID ja MMX-# vastab põhisegu reaktiivile 1, 2 või 3 v2.

Märkus. Mis tahes proov peab tulemuse andmiseks olema ühe rea kolmes järjestikuses veerus.

Märkus. Tööpõhise 1 tuleb lisada plaadil veergudesse 01, 04, 07 ja 10. Tööpõhise 2 tuleb lisada plaadil veergudesse 02, 05, 08 ja 11. Tööpõhise 3 v2 tuleb lisada plaadil veergudesse 03, 06, 09 ja 12.

Märkus. Ühele plaadile saab lisada kuni 30 proovi. Kui kõikide plaadil olevate proovide töötlemiseks on vaja rohkem kui ühte reaktiivikomplekti, peavad kõik komplektid olema samast partiist.

Reaktsiooni seadistamine

Tööpõhisegu (MMX-1, MMX-2 ja MMX-3 v2) valmistamine

Märkus. EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ja tööpõhisegu on valgustundlikud ning neid tuleb kaitsta pikaajalise kokkupuute eest valgusega.

Märkus. EGFR MMX-segude ja tööpõhisegu viskoossuse tõttu pipeteerige aeglaselt, et kogu segu väljuks otsikust.

Märkus. EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 ja EGFR MMX-3 v2 võivad olla helesinist või lillakat tooni. See ei mõjuta reaktiivi toimet.

Märkus. Valmistage eraldi 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutitesse ette kolm tööpõhisegu, millest üks sisaldab reaktiivi EGFR MMX-1, teine reaktiivi EGFR MMX-2 ja kolmas reaktiivi EGFR MMX-3 v2.

- Arvutage iga tööpõhisegu jaoks reaktiivi EGFR MMX-1 või EGFR MMX-2 või EGFR MMX-3 v2 vajalik maht järgmise valemi abil:

Reaktiivi EGFR MMX-1 või EGFR MMX-2 või EGFR MMX-3 v2 vajalik maht = (proovide arv + 2 kontrollproovi + 1) × 20 µl

- Arvutage iga tööpõhisegu jaoks vajalik MGAC vajalik maht järgmise valemi abil:

MGAC vajalik maht = (proovide arv + 2 kontrollproovi + 1) × 5 µl

Vt Tab. 22, et määrata kindlaks iga reaktiivi kogus, mis on vajalik tööpõhisegu valmistamiseks, võttes aluseks katseseeriasse kuuluvate proovide arvu.

Tab. 22 Tööpõhisegude töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks vajalikud reaktiivide kogused

		Proovide arv*									
		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
Iga tööpõhisegu kogumaht (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Proovide arvule vastavate koguste aluseks on järgmine summa: proovide arv + 2 kontrollproovi + 1

- Võtke 2...8 °C säilituskohast sobiv arv põhisegude EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 ja MGAC viaale. Segage iga reaktiivi 5 sekundit vortex-segistis ja koguge enne kasutamist katsuti põhjast vedelik. Märgistage tööpõhisegude töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks steriilne mikrotsentrifuugi katsuti.
- Lisage arvutatud kogus põhisegu EGFR MMX-1 või EGFR MMX-2 või EGFR MMX-3 v2 vastavasse tööpõhisegu katsutisse.
- Lisage tööpõhisegu katsutitesse arvutatud kogus MGAC-i.
- Segage piisava segamise tagamiseks katsuteid 3–5 sekundit vortex-segistis.

Märkus. Proovid ja kontrollproovid tuleb lisada AD-plaadile 1 tunni jooksul alates tööpõhisegu valmimisest.

Märkus. Kasutage ainult süsteemi cobas® 4800 AD-plaati ja kattekilet.

Plaadi ettevalmistamine

Märkus. Säilitatud DNA põhimaterjalikasutamise korral järgige jaotises **Proovide transportimine, säilitamine ja stabiilsus** esitatud juhiseid.

1. Pipeteerige igasse katseseeria jaoks vajalikku AD-plaadi reaktsiooniauku 25 µl tööpõhisegu. Ärge puudutage pipeteerija otsikuga plaati väljaspool auke.
 - Lisage töö-MMX-1 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-1**) AD-plaadi aukudesse veergudes 01, 04, 07 ja 10.
 - Lisage töö-MMX-2 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-2**) AD-plaadi aukudesse veergudes 02, 05, 08 ja 11.
 - Lisage töö-MMX-3 v2 (mis sisaldab põhisegu **EGFR MMX-3 v2**) AD-plaadi aukudesse veergudes 03, 06, 09 ja 12.
2. Pipeteerige 25 µl kontrollproovi **EGFR MC** AD-plaadi aukudesse **A01**, **A02** ja **A03**; segage põhjalikult pipetiga suspendeerides augu sees vähemalt kaks korda (aspireerides segu vähemalt kaks korda).
3. Pipeteerige uue pipeteerijaotsiku abil 25 µl kontrollproovi **NEG** AD-plaadi aukudesse **B01**, **B02** ja **B03**; segage põhjalikult pipetiga suspendeerides augu sees vähemalt kaks korda (aspireerides segu vähemalt kaks korda).

Märkus. Igas katseseerias peavad augud **A01**, **A02** ja **A03** sisaldama kontrollproovi (**EGFR MC**) ning augud **B01**, **B02** ja **B03** negatiivset kontrollproovi (**NEG**). Vastasel korral loeb analüsaator **cobas® z 480** katseseeria kehtetuks.

Märkus. Vahetage vastavalt vajadusele kindaid, et vältida proovide ristsaastumist ja PCR-reaktsiooni katsuti välispinna saastumist.

4. Kasutades iga proovi DNA jaoks uusi pipetiotsakuid lisage 25 µl esimese proovi DNA-d AD-plaadi aukudesse **C01**, **C02** ja **C03**; igasse auku proovi DNA lisamisel kasutage uut otsikut; segage igas augus olevat segu pipeti abil, aspireerides ja dispenseerides augu sees vähemalt kaks korda. Korrake seda toimingut iga proovi DNA-ga ja järgige Joonis 7 malli, kuni kõik DNA-proovid on lisatud AD-plaadile. Veenduge, et kogu vedelik on kogutud aukude põhja.

Märkus. Enne säilitatud DNA põhimaterjali kasutamist segage pulseerivalt ja tsentrifuugige põhimaterjali sisaldavat elutsioonikatsutit.

5. Katke mikrotiiterplaat (AD-plaat) kattekilega (kuulub plaatide tarnekomplekti). Kasutage kattekile aplikaatorit, et kinnitada kile kindlalt mikrotiiterplaadi (AD-plaadi) külge.
6. Veenduge enne PCR-i alustamist, et kogu vedelik on aukude põhjast kokku kogutud.

Märkus. Amplifikatsiooni ja tuvastamist tuleb alustada 1 tunni jooksul alates esimese proovi DNA lahjenduse lisamisest tööpõhise gule.

PCR-i alustamine

Üksikasjalikke juhiseid EGFR-töövooetappide kohta vt süsteemi **cobas® 4800** kasutaja käsiraamatust või süsteemi **cobas® 4800** kasutajaabist. Kui avaneb hüpikaken „Select test” (Valige test), valige „EGFR Plasma P1” ja vajutage nuppu „OK”.

Tulemused

Tulemuste tõlgendamine

Märkus. Kõik katseseeria ja proovi valideerimised teeb **cobas® 4800** tarkvara.

Märkus. Kehtiv katseseeria võib sisaldada nii kehtivaid kui ka kehtetuid proovide tulemusi.

Nõuetele vastavate tulemustega katseseeria puhul tõlgendatakse proovidega saadud tulemusi vastavalt: Tab. 23.

Tab. 23 cobas EGFR testi tulemuste tõlgendamine

Katsetulemus	Mutatsiooni tulemus	Poolkvantitatiivse indeksi (SQI) tulemus	Tõlgendus
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (mutatsioone võib olla rohkem kui üks)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (mutatsioone võib olla rohkem kui üks)	Mutatsioon avastati määratud sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas.
No Mutation Detected (NMD)*	NA	NA	Sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas mutatsiooni ei avastatud.
Kehtetu	NA	NA	Proovi tulemus on kehtetu. Korra kehtetute tulemustega proovide testimist vastavalt jaotises „Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine” esitatud juhiste.
Failed	NA	NA	Riist- või tarkvara tõrke tõttu nurjunud katseseeria. Pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohaliku esindusse.

* Tulemus „No Mutation Detected” ei välista mutatsiooni olemasolu sihtmärgiks olevas EGFR-i piirkonnas, kuna tulemused sõltuvad mutatsioonidega järjestuste kontsentratsioonist, proovide terviklikkusest, inhibiitorite juuresolekust ja avastamiseks piisava DNA-koguse olemasolust.

Tulemuste lipud on leitavad tulemuste vahekaardilt (ekraan) või lippude veerust (aruanne). Rohkem teavet vaadake jaotisest **Tulemuste lipud**.

Poolkvantitatiivne indeks (SQI)

SQI on proovis leiduva muteerunud cfDNA hulga poolkvantitatiivne mõõt, mida saab kasutada mutatsioonikoormuse erinevuste mõõtmiseks ajas. SQI väärtuse kasv näitab vastava sihtmärkmutsiooni hulga kasvu individuaalses prooviallikas; SQI väärtuse vähenemine näitab vastava sihtmärkmutsiooni üldise hulga vähenemist individuaalses prooviallikas. Esinduslikud SQI tulemused iga EGFR-i mutatsiooniklassi kohta, mis tuvastati testiga, on toodud lineaarsustulemustes Joonis 8 – Joonis 14.

Kehtetute tulemustega proovide uuesti testimine

1. Kui tööseeria on kehtetu, on iga proovi jaoks ebapiisav hulk ekstraheeritud DNAd amplifikatsiooni ja tuvastamise kordamiseks. Korrake kõikide proovide jaoks kogu testiprotseduuri alates DNA eraldamisest.
2. Kui tööseeria tulemused on kehtivad aga proov on kehtetu, on iga proovi jaoks ebapiisav hulk ekstraheeritud DNAd amplifikatsiooni ja tuvastamise kordamiseks. Korrake kehtetu proovi jaoks kogu testiprotseduuri alates DNA eraldamisest.

Kvaliteedikontroll ja tulemuste kehtivus

Igas 30 prooviga katseseerias on üks komplekt **cobas** EGFR testi mutatsiooni kontrollproove (**EGFR MC**) (augud **A01**, **A02** ja **A03**) ja negatiivseid kontrollproove (**NEG**) (augud **B01**, **B02** ja **B03**) töö-MMX-1, töö-MMX-2 ja töö-MMX-3 v2 jaoks. Katseseeria on kehtiv, kui **EGFR MC** ja **NEG** on kehtivad. Kui **EGFR MC** või **NEG** tulemused on kehtetud, on kogu katseseeria kehtetu ning seda tuleb korrata.

Mutatsioonikontroll

EGFR MC tulemus peab olema „Valid”. Kui **EGFR MC** kontrolliga saadakse järjepidevalt kehtetuid tulemusi, pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohalikku esindusse.

Negatiivne kontroll

NEG tulemus peab olema „Valid”. Kui **NEG** kontrolliga saadakse järjepidevalt kehtetuid tulemusi, pöörduge tehnilise abi saamiseks Roche'i kohalikku esindusse.

Meetodi piirangud

1. Analüüsida tuleb ainult ettenähtud proovitüüpe. **cobas** EGFR-test on valideeritud kasutamiseks Roche cfDNA katsutisse või K2 EDTA katsutisse kogutud verest eraldatud plasmaga.
2. **cobas** EGFR-testi toimivust kontrolliti komplektiga **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit.
3. Mutatsiooni avastamine sõltub koopiate arvust proovis ja seda võivad mõjutada proovi terviklikkus, eraldatud DNA kogus ja segavate ainete juuresolek.
4. Tulemuste usaldusväärsus sõltub transportimise, säilitamise ja töötlemise kvaliteedist. Järgige nendes kasutusjuhistes ja süsteemi **cobas**® 4800 kasutaja käsiraamatus või süsteemi **cobas**® 4800 kasutajaabis olevaid toiminguid.
5. Elutsioonikatsuti põhjast pipeteerimine võib sademetombukese lõhkuda ja avaldada testitulemustele ebasoodsat mõju.
6. AmpErase-ensüümi lisamine testi **cobas** EGFR Mutation põhisegule võimaldab sihtmärk-DNA-d valikuliselt amplifitseerida. Siiski on reaktiivide saastumise vältimiseks vaja järgida häid laboritöötavasid ja käesoleva kasutusjuhendi juhiseid.
7. Seda toodet tohivad kasutada vaid PCR-meetodit ja süsteemi **cobas**® 4800 väljaõppe saanud töötajad.
8. Selle tootega kasutamiseks on valideeritud ainult analüsaator **cobas**® z 480. Muid reaajas optilise määramisega termotsüklereid ei tohi selle tootega kasutada.
9. Tehnoloogiate sisemiste erinevuste tõttu on soovitatav, et kasutaja teeks enne ühelt tehnoloogialt teisele lülitumist oma laboris tehnoloogiate erinevuste hindamiseks meetodi korrelatsiooniuuringu.
10. PCR-i inhibiitorite esinemine võib põhjustada valenegatiivseid või kehtetuid tulemusi.
11. **cobas** EGFR testi praimerite ja/või sondidega kaetud EGFR-i geeni genoomse DNA piirkondades tekkinud mutatsioonid võivad tingida mutatsiooni olemasolu tuvastamise ebaõnnestumise eksonites 18, 19, 20 ja 21 (tulemus „No Mutation Detected”), kuigi seda esineb harva.

12. **cobas** EGFR test näitab ristreaktiivsust (tulemus „Mutation Detected”) 19. eksoni L747S-mutatsiooni, mis on haruldane omandatud mutatsioon, mis võib anda resistentsuse TKI-ravi suhtes.¹⁹
13. Kõrges kontsentratsioonis ($> 10^5$ koopiat/ml) testitavad proovid võivad põhjustada valesid tulemusi.
14. **cobas** EGFR-test on valideeritud kasutamiseks koos 25 µl DNA põhimaterjaliga reaktsioonიაugu kohta. 25 µl väiksemad DNA põhimaterjali kogused reaktsioonიაugu kohta pole soovitatavad.
15. Ülalkirjeldatud protseduuri järgides tuleb avastada EGFR-i mutatsioonide puhul (vt Tab. 3) ≥ 100 koopiat muteerunud DNA-d ühes ml Roche cfDNA katsutisse või K2 EDTA katsutisse kogutud vere plasmas.
16. Proovid, mille kohta registreeritakse tulemus „No Mutation Detected”, võivad sisaldada EGFR-i mutatsioone, mida katse ei tuvasta.
17. Plasma jaoks registreeritud tulemuse „No Mutation Detected” korral tuleb sel juhul kaaluda reflekstestimist või kinnitamist koetestiga.
18. Roche cfDNA katsutisse kogutud täisverest eraldatud plasma on piisav ainult üheks testimiseks.
19. Patsiendilt erinevatel aegadel saadud plasmat ei tohi ühendada.
20. **cobas** EGFR-testi toimivust ei ole määratud hüübinud proovide puhul, mis on kogutud Roche cfDNA katsutisse. Hüübinud proovid tuleb ära visata ja patsiendilt tuleb uus proov võtta.
21. Roche cfDNA katsutisse kogutud verest eraldatud plasmas on täheldatud hemolüüsi. Hemoglobiini kontsentratsioonid $> 2,0$ g/l võivad häirida **cobas** EGFR-testi toimivust.

Mittekliinilise toimivuse hindamine

Analüütilised tulemused

Järgnevad andmed on mõeldud **cobas** EGFR testi analüütilise soorituse demonstreerimiseks.

Analüütiline tundlikkus – tulemuse puudumise piir

cobas EGFR testi toimivuse hindamiseks ilma märklaud-DNA-ta ja tagamaks, et tühi proov ei tekita analüütilist signaali, mis võib osutada mutatsiooni madalale kontsentratsioonile, hinnati tervete doonorite K2 EDTA plasma EGFR metsiktüübi proove. Suunises CLSI EP17-A2²⁰ ette nähtud analüüsi kasutades tehti kindlaks, et tulemuse puudumise piir on kõikide mutatsioonide puhul null.

Tuvastamispiir rakuliini DNA-d kasutades

K2 EDTA plasma

EGFR-i metsiktüübi terve doonori K2 EDTA plasmale lisati rakuliini DNA-d, mis sisaldas kõiki seitsset mutatsiooni klassi, mida test avastas. Valmistati lahjendusseeriad ja **cobas** EGFR testi komplekti kõigi kolme komplekti partii abil testiti iga paneeliliikme 24 paralleelproovi.

Kõigi seitsme testiga avastatava mutatsiooniklassi tuvastamispiir määrati kõige väiksema DNA-kontsentratsiooni alusel, mis andis sihtmärgiks oleva mutatsiooni korral EGFR-i tulemuse „Mutation Detected” vähemalt 95% juhtudel. Tulemusi vt Tab. 24.

Tab. 24 cobas EGFR testi tuvastamispiir K2 EDTA plasmal kasutades

EGFR-i ekson	EGFR-i mutatsioonirühm	EGFR-i nukleiinhappejärjestus	Terve* DNA LoD (koopiat/ml)	Lõigatud** DNA LoD (koopiat/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

Erinevused vaadeldud LoD-s tulenevad DNA tausta erinevustest.

* Terve rakuliini DNA-l oli metsiktüübi DNA taust umbes 10 000 koopiat/ml.

** Rakuliini DNA-l, mis oli lõigustatud keskmiselt 220 aluspaari pikkuseks, oli metsiktüüpi DNA taust umbes 100 000 koopiat/ml.

Roche cfDNA plasma

Roche cfDNA katsutisse kogutud verest eemaldatud plasma puhul verifitseeriti LoD-väärtusi, lisades lõigustatud rakuliini DNA-d, millest igaüks sisaldas seitsset mutatsiooniklassi, mis tuvastati terve doonori Roche cfDNA plasma testimisel, mis oli EGFR-i jaoks metsikut tüüpi. Valmistati lahjendused eesmärgiga saavutada Tab. 24 toodud LoD-kontsentratsioonid ja testiti iga proovi 20 kordust, kasutades **cobas** EGFR-testikomplekti partiid. Tabavustase iga mutatsiooni korral oli 100%.

Kokkuvõttes suudab **cobas** EGFR-test standardkoguse (25 µl DNA põhimaterjali reaktsiooniaugu kohta kas K2 EDTA või Roche cfDNA plasmal) kasutamisel tuvastada EGFR-i 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioone, tuvastades ≤ 100 muteerunud DNA koopiat ühes ml plasmal.

Ristreaktsioonid teiste 18., 19., 20. ja 21. eksoni mutatsioonidega

AURA Extension ja AURA2 kliinilise uuringu proovid

cobas EGFR test andis tulemuse „Mutation Detected” järgmistele EGFR-i mutatsioonidele AURA Extension ja AURA2 kliiniliste uuringute proovides (Tab. 25). AURA Extension uuring oli mõeldud AURA2 kohordi proovide täiendamiseks ja plasmast haruldaste mutatsioonide tuvastamise tõenäosuse suurendamiseks. **cobas** EGFR testi analüütilisi tulemusi nende mutatsioonide määramisel ei ole hinnatud.

Tab. 25 Mutatsioonid, mis esinevad AURA Extensionis ja AURA2 Trialis ja ristreageerivad cobas EGFR testiga

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Ei leitud
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Ei leitud
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Ei leitud

Spetsiifilisus – mikroorganism

cobas EGFR testi spetsiifilisust hinnati, kasutades *Staphylococcus epidermidis* 1×10^6 pesa moodustavat ühikut, mis ei põhjustanud ristreaktsiooni ega seganud **cobas** EGFR testi reaktsiooni terve doonori metsiktüüpi ja muteerunud EGFR-järjestusi sisaldavate K2 EDTA plasma proovidele lisamisel.

Segavad mõjurid

K2 EDTA plasma

Triglütseriidide (37 mM, CLSI soovitatav kõrge kontsentratsioon²¹), 0,2 g/l bilirubiini (konjugeerimata või konjugeeritud, CLSI soovitatav kõrge kontsentratsioon on²¹) ja hemoglobiini 1,5 g/l ei seganud **cobas** EGFR testi tegemist, kui potentsiaalselt segav aine lisati terve doonori metsiktüüpi ja muteerunud EGFR-järjestusi sisaldavatele K2 EDTA plasma proovidele. Hemoglobiini 2,0 g/l kontsentratsioon plasmas segab **cobas** EGFR testi tegemist. Albumiini kontsentratsioon ≥ 60 g/l (60 g/l, CLSI soovitatav kõrge kontsentratsioon²¹) võib **cobas** EGFR testi tegemist segada.

Uuringu tulemused näitavad, et EDTA, Neupogen ja TARCEVA® ei sega **cobas** EGFR testi, kui potentsiaalselt segav aine lisati terve doonori metsiktüüpi ja muteerunud EGFR-järjestusi sisaldavatele K2 EDTA plasma proovidele.

Roche cfDNA plasma

On näidatud, et triglütseriidid (37 mM, CLSI soovituslikult suur kontsentratsioon²¹), 0,2 g/l bilirubiini (konjugeerimata või konjugeeritud, CLSI soovituslikult suur kontsentratsioon²¹), hemoglobiin (2,0 g/l) ja albumiin (60 g/l, CLSI soovituslikult suur kontsentratsioon²¹) ei häiri **cobas** EGFR-testi, kui potentsiaalselt segav aine lisati terve doonori Roche cfDNA plasma proovidesse, mis sisaldavad metsiktüüpi ja muteerunud EGFR-järjestusi.

Lineaarsus

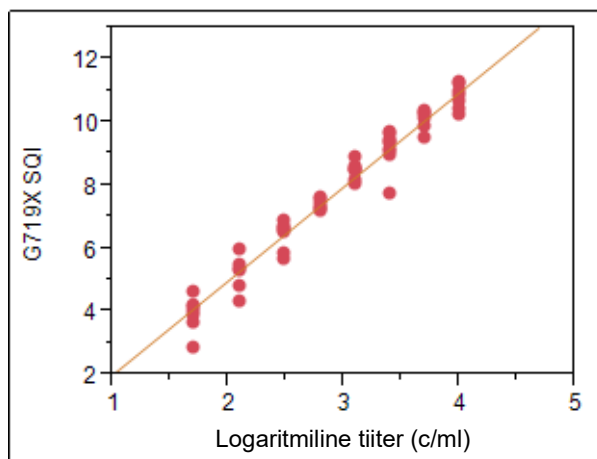
K2 EDTA plasma

cobas EGFR testi lineaarsusuuring tehti vähemalt 8 paneeli liikme lahjendusseeriaga vastavalt iga testiga avastatava EGFR-i mutatsiooni klassi peamise mutatsiooni lineaarsusvahemikule. Paneeli liikmete valmistamiseks lahjendati EGFR-i metsiktüübi terve doonori K2 EDTA plasmas rakuliini DNA-d, mis sisaldasid kõiki peamisi mutatsioone. Hinnati vastavalt CLSI EP-06A juhisele.²⁴ Testiti kümmet paralleelproovi paneeli liikme kohta kahe partii suhtes kontsentratsiooniga kuni 1,0E+04 koopiat/ml (iga kontsentratsioonitaseme kohta 20 paralleelproovi). Ühte paralleelproovi partii kohta testiti kontsentratsiooniga üle 1,0E+04 koopiat/ml.

Iga **cobas** EGFR testi mutatsiooni klassi jaoks on näidatud lineaarsusvahemik (Tab. 26) ja ühe partii vastavad graafikud (Joonis 8 kuni Joonis 14).

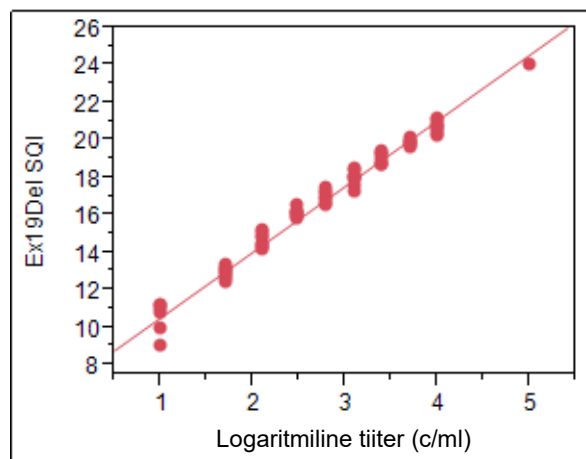
Tab. 26 cobas EGFR testi lineaarsusvahemik K2 EDTA plasmaga

EGFR-i ekson	EGFR-i mutatsioon	Sihtmärk-nukleiinhappejärjestus	Lineaarsusvahemik (koopiat/ml)
18	G719A	2156G>C	50 – 1E+04
19	19. eksoni deletsioon	2235_2249del15	10 – 1E+05
20	S768I	2303G>T	10 – 1E+05
20	T790M	2369C>T	50 – 1E+05
20	20. eksoni insertioon	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10 – 1E+05
21	L858R	2573T>G	10 – 1E+05
21	L861Q	2582T>A	10 – 1E+05

**Joonis 8 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
G719A rakuliini DNA**

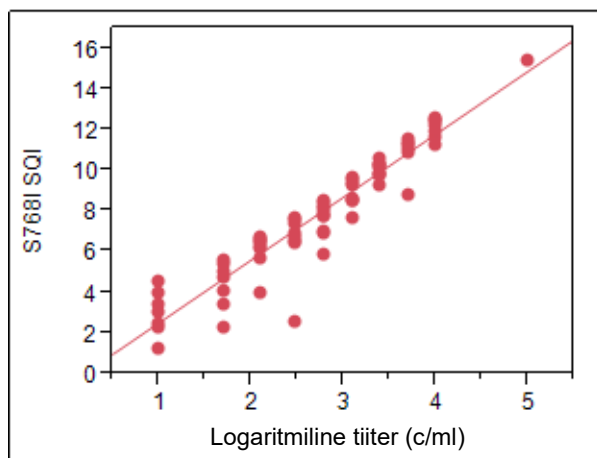
$$\text{SQI} = -0,987 + 2,986 \times \log \text{koopiat/ml}$$

$$R^2 = 0,968$$

**Joonis 9 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
19. eks. kust. rakuliini DNA**

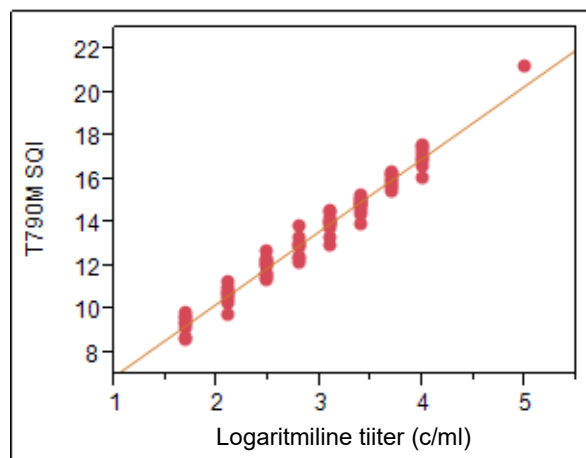
$$\text{SQI} = 7,042 + 3,507 \times \log \text{koopiat/ml}$$

$$R^2 = 0,981$$

**Joonis 10 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
S768I rakuliini DNA**

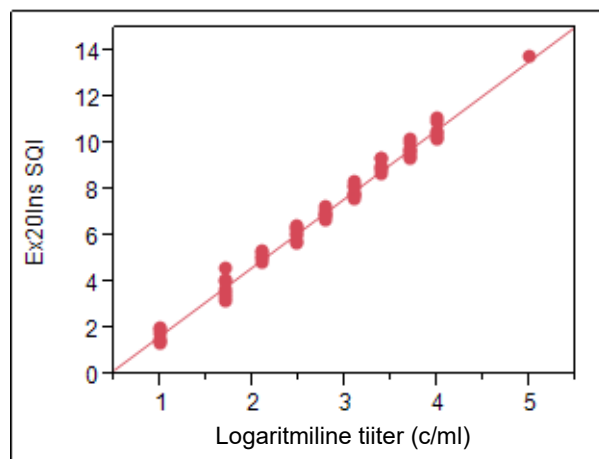
$$\text{SQI} = -0,578 + 3,093 \times \log \text{koopiat/ml}$$

$$R^2 = 0,912$$

**Joonis 11 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
T790M rakuliini DNA**

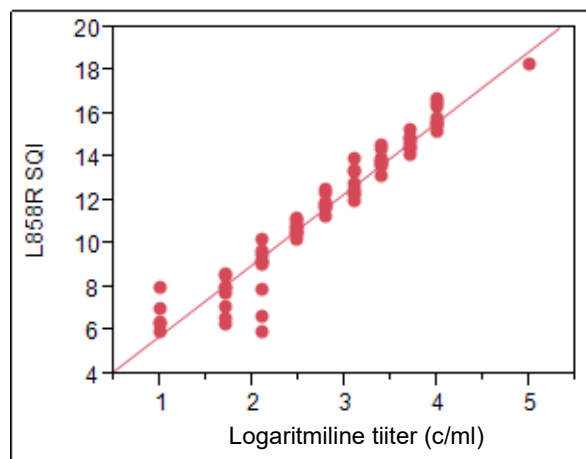
$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \log \text{koopiat/ml}$$

$$R^2 = 0,973$$

**Joonis 12 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
20. eks. sis. rakuliini DNA**

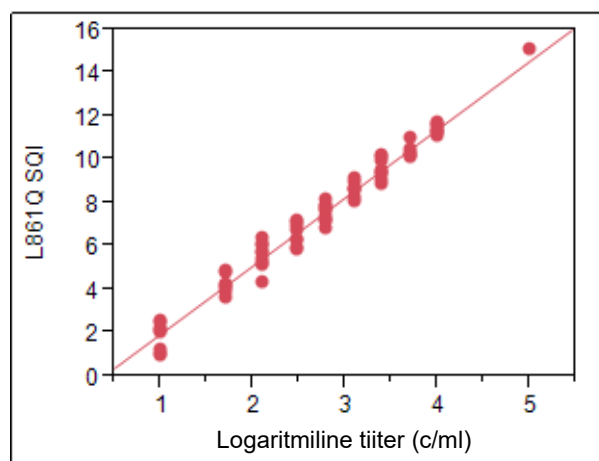
$$\text{SQI} = -1,268 + 2,973 \times \log \text{koopiat/ml}$$

$$R^2 = 0,990$$

**Joonis 13 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
L858R rakuliini DNA**

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

$$R^2 = 0,933$$

**Joonis 14 Muteerunud DNA lineaarsus K2 EDTA plasmas:
L861Q rakuliini DNA**

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

$$R^2 = 0,980$$

Roche cfDNA plasma

Roche cfDNA plasma lineaarsusvahemikku verifitseeriti, kasutades vähemalt 6 paneeliliikme lahjendusrida, mis hõlmasid K2 EDTA plasmaproovide lineaarsusvahemikku (Tab. 26). Paneeliliikmed valmistati ette, lahjendades lõigustatud rakuliini DNA-d, mis sisaldas kõiki peamisi mutatsioone, EGFR-i metsiktüüpi terve doonori Roche cfDNA plasmas. Analüüsi tegemisel järgiti CLSI juhendit EP06-A.²⁴ Testiti kahest partiist kummagi jaoks nelja paralleelproovi paneeli liikme kohta kontsentratsiooniga kuni 1,0E+04 koopiat/ml (iga kontsentratsioonitaseme kohta 8 paralleelproovi). Testiti 2 paralleelproovi kontsentratsiooniga üle 1,0E+04 koopiat/ml (iga kontsentratsioonitaseme kohta 4 paralleelproovi).

Korratavus

cobas EGFR testi korratavuse hindamiseks kasutati 12-st proovist koosnevat paneeli, mis sisaldas terve doonori K2 EDTA plasma proovides lahjendatud EGFR Mutant rakuliini DNA-d. Iga testiga avastatav peamist mutatsiooniklassi sisaldav proov kaaslajendati 11-sse proovi ja hinnati iga vastava mutatsiooni kolmekordse LoD-taseme (koopiat/ml) suhtes, 1,0E+03 koopiat/ml ja 5,0E+04 koopiat/ml suhtes. Testiti ka ühte metsiktüüpi proovi. Kõik kaksteist dubleerivat proovi analüüsiti 4 päeva jooksul kahe laborandi poolt kahe reaktiivipartiiga, kasutades kahte analüsaatorit **cobas**® z 480 (N = 32 proovi kohta). **cobas** EGFR testi õigete hinnangute täpsus oli 99,2% (381/384).

Tab. 27 näitab korratavuse uuringu keskmist SQI-d ja SQI SD-d. Kõik 32 metsiktüüpi proovi andsid oodatava tulemuse „No Mutation Detected”.

Tab. 27 Korratavuse uuringu keskmine SQI ja SQI SD

EGFR-i ekson	EGFR-i mutatsioon	Sihtmärk-nukleiinhappejärjestus	Kontsentratsioon (koopiat/ml)	Keskmine 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-i metsiktüüp			0	NMD	NMD

NMD = Mutatsiooni ei tuvastatud (No Mutation Detected)

Kliinilise toimivuse hindamine

Kliiniline reprodutseeritavus K2 EDTA plasmaga

Uuring tehti eesmärgiga hinnata testi **cobas** EGFR Test reprodutseeritavust kolmes testimiskohas (2 välist ja 1 sisemine, 2 töötajat ühel testimiskohal), 3 reaktiivipartiid ja 3 mittejärjestikust testimispäeva, kasutades 9-liikmelist kunstlikku NSCLC plasmas lahjendatud rakuliini DNA-proovide paneeli. Mutatsioonid hõlmasid üht 18. eksoni mutatsiooni G719X, üht 19. eksoni deletsioonmutatsiooni, kaht 20. eksoni T790M mutatsiooni, üht 20. eksoni insertioonmutatsiooni, üht 21. eksoni L858R mutatsiooni ja üht 21. eksoni L861Q mutatsiooni, mis olid esindatud neljas kunstlikus proovis nagu kokku võetud Tab. 28. Iga kunstlik proov valmistati kahes kontsentratsioonis: umbes 100 koopiat/ml ja umbes 300 koopiat/ml. Need kunstlikud proovid jaotati lisaks metsiktüüpi kontrollpaneelile kaheksasse erinevasse paneeli kokku üheksaliikmeline paneel.

Tab. 28 Kunstlikud mutatsioonikombinatsioonide proovid

Rakuliin DNA kombinatsiooniga 1	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 2	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 3	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 4
19. eksoni deletsioon	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	20. eksoni insertioon

Kokku tehti 37 katseseeriat, neist 36 olid kehtivad ja üks mittekehtiv. Kokku testiti 648 paneeli (ehk 1224 mutatsiooni), neist 646 paneeli (ehk 1220 mutatsiooni) tulemused olid kehtivad. Metsiktüüpi paneeliliikmete 72 kehtivate tulemustega testides polnud ühtki tulemust „Mutation Detected”, seega oli kokkulangevus 100%. Mutatsiooniliikmeti on kokkulangevused erinevad: kaheksal juhul 100%, viiel juhul > 97% ja ühe (G719X) mutatsiooni puhul alla 90%. Üldine kokkulangevus mutatsioonide kaupa on esitatud Tab. 29. Kõigi mutatsioonipaneeli liikmete variatsioonikordaja (CV) oli $\leq 12,8\%$. Sisemiste ja mutantsete kontrollide üldine CV oli $\leq 1,5\%$. Partiidevaheline CV oli $\leq 0,89\%$ ja partiidesisene $\leq 1,47\%$.

Tab. 29 Üldised kokkulangevuse hinnangud mutatsiooniliikmete kaupa reprodutseeritavuse uuringus

Mutatsiooniliikmed	Kehtiva tulemuse andnud testide arv	Kokkulangevus N	Kokkulangevuse % (95% CI) ^a
Metsiktüüp – pole saadaval	72	72	100 (95,0, 100,0)
18. eksoni G719A – 100 koopiat/ml	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
19. eksoni deletsioon (2235_2249del15) – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni insertioon (2307_2308ins9) – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni S768I – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni T790M – 100 koopiat/ml	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
21. eksoni L858R – 100 koopiat/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
21. eksoni L861Q – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
18. eksoni G719A – 300 koopiat/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
19. eksoni deletsioon (2235_2249del15) – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni insertioon (2307_2308ins9) – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni S768I – 300 koopiat/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
20. eksoni T790M – 300 koopiat/ml	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
21. eksoni L858R – 300 koopiat/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
21. eksoni L861Q – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)

^a 95% CI = 95% täpne binominaalne usaldusvahemik.

^b Madalam kokkulangevus selle proovis oli tingitud mitmest (n = 6/24 kombineeritud kordust) mutatsioonimääramise tehniliselt negatiivsest (mismatch) tulemusest (SNP asendus, insertioon või deletsioon), mis ilmnisid valdavalt ühes lookuses kolmest.

Märkus. Tulemused langesid kokku, kui mutantne paneeliliige andis kehtiva tulemuse „Mutation Detected” või metsiktüüpi paneeliliige andis kehtiva tulemuse „No Mutation Detected”.

Märkus. Selles uuringus kasutatud rakuliini DNA proovid koosnesid mehaaniliselt keskmiselt 220-aluspaaristeks osadeks lõigatud osadest ja sisaldasid metsiktüüpi rakuliini DNA-d kontsentratsiooniga umbes 12 000 koopiat/ml.

Kliiniline reprodutseeritavus Roche cfDNA plasmaga

Uuring tehti eesmärgiga hinnata **cobas** EGFR-testi reprodutseeritavust kolmes testimiskohas (2 välist ja 1 sisemine, 2 töötajat ühel testimiskohal), üks reaktiivipartii ja 3 mittejärjestikust testimispäeva, kasutades kolme 9-liikmelist kunstlikku terve doonori plasmas lahjendatud rakuliini DNA-proovide paneeli. Iga kogumi proovid koguti Roche cfDNA katsutite unikaalse partiiga. Igal testimiskohal testiti kahte plasmapaneele. Mutatsioonid hõlmasid üht 18. eksoni mutatsiooni G719X, üht 19. eksoni deletsioonmutatsiooni, üht 20. eksoni T790M mutatsiooni, üht 20. eksoni insertioonmutatsiooni, üht 21. eksoni L858R mutatsiooni ja üht 21. eksoni L861Q mutatsiooni, mis olid esindatud neljas kunstlikus proovis, nagu kokku võetud Tab. 30. Iga kunstlik proov valmistati kahes kontsentratsioonis: umbes 100 koopiat/ml ja umbes 300 koopiat/ml. Need kunstlikud proovid jaotati lisaks metsiktüüpi kontrollpaneelile kaheksasse erinevasse paneeli kokku üheksaliikmeline paneel.

Tab. 30 Kunstlikud mutatsioonikombinatsioonide proovid

Rakuliin DNA kombinatsiooniga 1	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 2	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 3	Rakuliin DNA kombinatsiooniga 4
19. eksoni deletsioon	S768I	T790M	L858R
20. eksoni insertioon	G719A	L861Q	NA

Kokku tehti 36 katseseeriat ja kõik seeriad olid kehtivad. Kokku testiti 648 paneeli, neist 646 paneeli (ehk 1220 mutatsiooni) tulemused olid kehtivad. Metsiktüüpi paneeliliikmete 72 kehtiva tulemusega testides oli üks tulemus „Mutation Detected”, seega oli kokkulangevus 98,6%. Kokkulangevused on mutatsiooniliikmete vahel erinevad: kolmteist saavutasid kokkulangevuse 100%, üks > 98%. Üldine kokkulangevus mutatsioonide kaupa on esitatud Tab. 31. Kõigi mutatsioonipaneeli liikmete variatsioonikordaja (CV) oli ≤ 13,7%. Sisemiste ja mutantsete kontrollide üldine CV oli ≤ 1,3%.

Tab. 31 Üldised kokkulangevuse hinnangud mutatsiooniliikmete kaupa reprodutseeritavuse uuringus

Mutatsiooniliikmed	Kehtiva tulemuse andnud testide arv	Kokkulangevus N	Kokkulangevuse % (95% CI) ^a
Metsiktüüp – pole saadaval	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
18. eksoni G719A – 100 koopiat/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
19. eksoni deletsioon (2235_2249del15) – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni insertioon (2307_2308ins9) – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni S768I – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni T790M – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
21. eksoni L858R – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
21. eksoni L861Q – 100 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
18. eksoni G719A – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
19. eksoni deletsioon (2235_2249del15) – 300 koopiat/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
20. eksoni insertioon (2307_2308ins9) – 300 koopiat/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
20. eksoni S768I – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
20. eksoni T790M – 300 koopiat/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
21. eksoni L858R – 300 koopiat/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
21. eksoni L861Q – 300 koopiat/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a 95% CI = 95% täpne binominaalne usaldusvahemik.

Märkus. Tulemused langesid kokku, kui mutantne paneeliliige andis kehtiva tulemuse „Mutation Detected” või metsiktüüpi paneeliliige andis kehtiva tulemuse „No Mutation Detected”.

Tuvastamispiir (LoD), kasutades NSCLC plasmaproove

Tehti uuring, et kinnitada LoD-i K2 EDTA NSCLC plasmaproovidega kolme 19. eksoni deletsiooni ühe L858R-mutatsiooni ja ühe T790M-mutatsiooni suhtes, kasutades **cobas** EGFR-testi kolmes erinevas testimiskohas (kaks välist ja üks sisemine, kaks laboranti igas testimiskohas), kolm reaktiivipartiid ja kaks mittejärgnevat testipäeva, 11-liikmeline NSCLC-plasmaproovide paneel (igas viis mutatsiooni kahes kontsentratsioonis: 1 × LoD ja 2 × LoD; lisaks metsiktüüp). Kokku tehti 12 katseseeriat (kaks paralleelproovi seeria kohta) ja kõik seeriad olid kehtivad. Kokku tehti 264 testi 11-liikmelise paneeliga, millest 262 (99,2%) olid kehtivad. Metsiktüüpi paneeli liikmete 23 kehtivate tulemustega testides polnud ühtki „Mutation Detected” tulemust, seega oli kokkulangevus 100%. 20. eksoni T790M – 1 × LoD-i kokkulangevus on 95,8% ja kõigi muude mutantsete paneeli liikmetega 100%. Kokkulangevuse hinnangud on paneelide liikmeti kokku võetud Tab. 32. Kõigi mutatsioonipaneeli liikmete variatsioonikordaja (CV) oli < 7,0%.

Tab. 32 Kokkulangevuse hinnangud paneelide liikmeti

Paneeliliige	Kehtiva tulemuse andnud testide arv	Kokkulangevus N	Kokkulangevuse % (95% CI) ^a
Metsiktüüp – pole saadaval	23	23	100 (85,2, 100,0)
19. eksoni deletsioon 1 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
19. eksoni deletsioon 1 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
19. eksoni deletsioon 2 – 1 × LoD	23	23	100 (85,2, 100,0)
19. eksoni deletsioon 2 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
19. eksoni deletsioon 3 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
19. eksoni deletsioon 3 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
20. eksoni T790M – 1 × LoD	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
20. eksoni T790M – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
21. eksoni L858R – 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
21. eksoni L858R – 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a 95% CI = 95% täpne binominaalne usaldusvahemik.

Märkus. Tulemusi käsitletakse kokkulangevatena, kui mutantne paneeliliige andis kehtiva tulemuse „Mutation Detected” või metsiktüüpi paneeliliige andis kehtiva tulemuse „No Mutation Detected”.

Märkus. Selles kliinilises uuringus kasutatud proovide metsiktüüpi DNA taust oli umbes 24 000 koopiat/ml.

Roche cfDNA plasma korrelatsioon K2 EDTA plasmaga

cobas EGFR-testi toimivust K2 EDTA plasma ja Roche cfDNA plasmaga võrreldi proovide paneeli testimisega, mis sisaldas paarisproove 34 EGFR-i metsiktüüpi NSCLC patsiendilt, 17 EGFR-i positiivse mutatsiooniga NSCLC patsiendilt ja 20 tervelt doonorilt. Tervete doonorite proove kasutati surrogaatproovide koostamiseks, mis koosnevad lõigustatud rakuliini DNA-st koos peamiste mutatsioonidega, lisatuna K2 EDTA ja Roche cfDNA katsutitest võetud täisverele, mida tuvastas **cobas** EGFR-test. Lõigustatud rakuliini DNA lisamistase surrogaatproovi oli umbes $1,5 \times \text{LoD}$ iga mutatsiooni kohta, määratuna K2 EDTA plasmaga (Tab. 24). Mutatsiooni olek kinnitati iga NSCLC patsiendi puhul, kasutades NGS-meetodit. Igat proovi testiti ühe **cobas** EGFR-testireaktiivide partiiga. Kõik proovid andsid kehtivad tulemused ja võrdlustulemused on näidatud Tab. 33.

Tab. 33 Ühilduvuse analüüs K2 EDTA plasma ja Roche cfDNA katsutist saadud plasma vahel

		K2 EDTA katsuti		Kokku
		MD	NMD	
Roche Cell-Free DNA Tube	MD	37	0	37
	NMD	0	34	34
	Kokku	37	34	71

Positiivne ühilduvus (%):	100%
95% usaldusvahemik	90,5–100%
Negatiivne ühilduvus (%):	100%
95% usaldusvahemik	89,7–100%
Üldine ühilduvus (%):	100%
95% usaldusvahemik	94,5–100%

Seletus: MD = tuvastatud mutatsioon ja NMD = mutatsiooni ei tuvastatud

K2 EDTA plasma ja katsutist Roche Cell-Free DNA Collection Tube saadud plasma ühilduvus oli 100%. Vastuolulisi tulemusi ei täheldatud.

Uuringu plasmaproovides tuvastas **cobas** EGFR-test EGFR-geeni 18., 19., 20. ja 21. eksonis järgmised mutatsioonid (vt Tab. 34). Kui ei märgitud vastupidi, täheldati NSCLC proovides mutatsioone.

Tab. 34 Roche cfDNA plasma korrelatsioonis K2 EDTA plasmaga täheldatud mutatsioonid

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	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	Ei leitud
	2237_2251del15§	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC§	L747P	24267
	2251A>C§	T751P	Ei leitud
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* täheldatud ainult surrogaatproovis

⁺ täheldatud surrogaatproovis ja NSCLC-proovis

§ täheldatud ainult NSCLC-proovis

Vastavus standardmeetodiga, kasutades III faasi plasmaproove ASPIRATION-i kohordist

cobas EGFR-testi 19. eksoni deletsiooni ja L858R-mutatsioonide tuvastamise analüütilist täpsust hinnati valideeritud järgmise põlvkonna järjestamistehnoloogia (NGS) platvormi abil ühes või rohkemas järgnevas uuringus (ASPIRATIONI kohort) osalenud kauglearenenud mitteväikeserakulise kopsuvähiga (NSCLC) patsientide K2 EDTA plasmaproove kasutades: Genentech kliinilised uuringud G027821 (MetMab) ja G027761 (MetLung) koos Roche'i kliinilise uuringuga ML25637 (ASPIRATION).

128 plasmaproovi mahus 2 ml ja kehtiva paaristulemusega nii **cobas** EGFR testiga kui ka NGS-meetodil analüüsitud plasmaproovid hõlmati EGFR-i 19. eksoni deletsiooni või L858R mutatsiooni kokkulangevuse analüüsi. NGS-meetodil tuvastati 32-s proovis MD ja 95-s proovis NMD. **cobas** EGFR testi iplasmas ja NGS-i PPA oli plasma puhul 87,5% (95% CI: 71,9%, 95,0%); **cobas** EGFR test ja NGS-i vaheline NPA oli 96,8% (95% CI: 91,1%, 98,9%), nagu esitatud Tab. 35.

Tab. 35 cobas EGFR testi ja NGS-i EGFR-i 19. eksoni deletsioonide või L858R mutatsiooni plasmas tuvastamise võrdlus

Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	87,5% (28/32)	71,9%, 95,0%
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	96,8% (92/95)	91,1%, 98,9%

cobas EGFR testi plasma- ja koeproovide tuvastatud 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni kokkulangevus kasutades III faasi proove ENSURE-ilt

ENSURE uuring (YO25121) oli mitmekeskuseline avatud randomiseeritud III faasi uuring hindamaks TARCEVA® (erlotiniib) a gemsitabiini/tsisplatiini võrdluses esmaravi ohutust IIIB/IV staadiumi mitteväikerakulise kopsuvähiga (NSCLC) patsientidel, kelle epidermaalse kasvufaktori retseptori (EGFR) geeni türosiinkinaasi domeenis on 19. eksoni deletsioon või L858R-mutatsioon. Kokku uuriti 647 patsienti, neist 601-l olid EGFR-i 19. eksoni deletsiooni ja L858R-mutatsiooni koeproovi analüüsi tulemused **cobas** EGFR-testiga kehtivad ja 217 uuringus osalenud patsienti olid randomiseeritud.

517 patsiendil (86,0%, 517/601) olid kokkulangevad K2 EDTA plasma- ja koeproovid ning 441 patsiendil oli plasma-proovi maht $\geq 2,0$ ml, mis on **cobas** EGFR-testi jaoks valideeritud plasma maht.

cobas EGFR testi plasma ja koeproovide tulemuste kokkulangevust 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni tuvastamisel hinnati nii eraldi- kui kobaranalüüsis. Kokku hõlmati **cobas** EGFR testi kokkulangevusanalüüsiks 431 kehtiva paaristulemusega koe- ja plasmaproovi. 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni tuvastamisel oli positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA) plasma- ja koeproovi vahel 76,7%, (95% CI: 70,5–81,9%), negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA) oli 98,2% (95% CI: 95,4–99,3%), nagu esitatud Tab. 36. 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni eraldi tuvastamise PPA, NPA ja OPA on samuti esitatud Tab. 36.

Tab. 36 Plasma- ja koeproovide kokkulangevus cobas EGFR testiga 19. eksoni deletsiooni ja L858R mutatsiooni tuvastamisel

Mutatsioon	Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Kokkuvõtlikult	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	76,7% (161/210)	70,5%, 81,9%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	98,2% (217/221)	95,4%, 99,3%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	87,7% (378/431)	84,2%, 90,5%
19. eksoni deletsioon	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	80,8% (97/120)	72,9%, 86,9%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	98,7% (307/311)	96,7%, 99,5%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	93,7% (404/431)	91,0%, 95,7%
L858R	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	67,8% (61/90)	57,6%, 76,5%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	99,1% (338/341)	97,4%, 99,7%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	92,6% (399/431)	89,7%, 94,7%

Märkus. PPA ja NPA arvutati, kasutades võrdlusena koematerjali.

19. eksoni ja L858R tuvastamise positiivne ennustusväärtus (PPV) ja negatiivne ennustusväärtus (NPV) arvutati, kasutades ka bootstrap-meetodit, mis arvestab esinemissageduse (Tab. 37) erinevust erinevates kudedes. EGFR mutatsiooni esinemissageduse suurenemisel PPV oodatult suureneb ja NPV väheneb. Valgete patsientide populatsioonis, kus EGFR mutatsiooni esinemissagedus kudedes on eeldatavalt 10–15%, kõigub PPV vahemikus 82,8–88,6% ja NPV vahemikus 96,0–97,4%. Aasia populatsiooni esinemissagedusele põhinedes kõigub PPV 94,8% ja 97,8% ning NPV 80,8% ja 90,9% vahel, kui eeldada kudedes EGFR-i mutatsiooni esinemissageduseks 30–50%.

Tab. 37 cobas EGFR testi hinnangulised ennustusväärtused koeproovide ja cobas EGFR testi plasmaproovide (patsientide plasmaproovi maht $\geq 2,0$ ml) jaoks, põhineb EGFR mutatsiooni esinemissageduse erinevusel erinevates kudedes

Koeproovidele põhinev eeldatav EGFR esinemissagedus	Positiivne ennustusväärtus (PPV)	Negatiivne ennustusväärtus (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%)

Märkus. 95% CIs arvutati bootstrap meetodil.

Märkus. 79 alla $< 2,0$ ml mahuga proovi tulemusi käsitleti selles analüüsis kehtetutena.

Märkus. PPV ja NPV arvutati, kasutades võrdlusena plasmat.

Korrelatsioon standardmeetodiga AURA2 uuringu II faasi proovide kasutamisel

Testi **cobas** EGFR kliinilist sooritust hinnati võrdluses kinnitatud järgmise põlvkonna järjestamisplatvormiga, kasutades K2 EDTA plasmaproove kaugelearenenud NSCLC-ga patsientidelt, keda oli analüüsitud II faasi AURA2 TAGRISSO® uuringus.²³

383-st kõlblikust patsiendist 344 plasmaproov oli saadaval, neist **cobas** EGFR testiga analüüsitud tulemustest olid 342 kehtivad ja 2 kehtetud. Kõigist **cobas** EGFR testiga analüüsitud 344 proovist analüüsiti 322 (93,6%) ka NGS-meetodil ja 22-l juhul ei olnud NGS-i jaoks jäänud piisavalt plasmamahtu.

Hinnati **cobas** EGFR testi analüütilist täpsust T790M mutatsiooni tuvastamisel plasmaproovides võrdluses standardmeetodi NGS-iga. Kokkulangevusanalüüsi hõlmati 320 nii **cobas** EGFR testi kui ka NGS-i analüüsil saadud kehtiva paaristulemusega proovi andmed. Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA) **cobas** EGFR testi ja NGS vahel oli 91,5% (95% CI: 85,7–95,1%), negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA) oli 91,1% (95% CI: 86,0–94,4%), T790M mutatsiooni detekterimisel, nagu esitatud Tab. 38.

Tab. 38 cobas EGFR testi plasmas ja NGS-i võrdlus EGFR T790M mutatsiooni tuvastamisel

Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	91,5% (129/141)	85,7%, 95,1%
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	91,1% (163/179)	86,0%, 94,4%

AURA2 uuringu K2 EDTA plasmaproovides tuvastas **cobas** EGFR-test EGFR-geeni 18., 19., 20. ja 21. eksonis mutatsioonid (vt Tab. 39).

Tab. 39 cobas EGFR testiga AURA2 kohordis tuvastatud mutatsioonid

Ekson	Mutatsiooni järjestus	AA muutus	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	Ei leitud
	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	Ei leitud
	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	Ei leitud
	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

Plasma ja koeproovide kokkulangevus kasutades II faasi AURA2 proove T790M mutatsiooni määramiseks

AURA2 kliiniline²³ uuring oli II faasi avatud üheharuline uuring, hindamaks ravimi TAGRISSO® (osimertiniib) ohutust ja tõhusust teise või $\geq$ kolmanda ravivalikuna kaugelearenenud mitteväikerakulise kopsuvähiga (NSCLC) patsientidel, kelle kasvaja oli progresseerunud pärast ravi heakskiidetud EGFR TKI preparaadiga ja kes olid **cobas** EGFR-testi tulemuse kohaselt T790M-positiivsed. Kokku analüüsiti 472 patsienti, neist 383 patsiendil koeproovi, viimastest 371 patsiendil oli **cobas** EGFR testi EGFR-i T790M mutatsiooni analüüsi tulemus kehtiv, neist 233 patsienti olid T790M-positiivsed ja 210 patsienti randomiseeriti uuringus.

383 kõlblikust patsiendist 344-l oli K2 EDTA plasmaproov. Kokku hõlmati analüüsi 334 **cobas** EGFR testi kohaselt kehtiva paaristulemusega koe- ja plasmaproovi. Plasma- ja koeproovide positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA) oli 58,7% (95% CI: 52,2%, 65,0%) ja negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA) oli 80,2% (95% CI: 71,8%, 86,5%) T790M mutatsiooni tuvastamisel. Positiivne ennustusväärtus (PPV) oli 85,6% (95% CI: 79,2%, 90,3%) ja negatiivne ennustusväärtus (NPV) oli 49,2% (95% CI: 42,0%, 56,4%) T790M mutatsiooni tuvastamisel, nagu esitatud Tab. 40.

Tab. 40 näidatud PPV-d mõjutasid 22 proovi, mis olid koes **cobas** EGFR testi kohaselt T790M-negatiivsed ja plasmas **cobas** EGFR testi kohaselt T790M-positiivsed. 18 plasmaproovi olid NGS-i kohaselt T790M-positiivsed ja üks proov ei kvalifitseerunud vähese mahu tõttu NGS-analüüsiks. Vaid 3 olid NGS-i kohaselt T790M-negatiivsed.

Tab. 40 Plasma- ja koeproovide analüüsitulemuste kokkulangemine T790M mutatsiooni tuvastamisel cobas EGFR testiga

Mutatsioon	Kokkulangevuse mõõt	Protsentuaalne kokkulangevus (N)	95% usaldusvahemik
T790M	Positiivne protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	58,7% (131/223)	52,2%, 65,0%
	Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	80,2% (89/111)	71,8%, 86,5%
	Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	65,9% (220/334)	60,6%, 70,8%
	Positiivne ennustusväärtus (PPV)	85,6% (131/153)	79,2%, 90,3%
	Negatiivne ennustusväärtus (NPV)	49,2% (89/181)	42,0%, 56,4%

Märkus. PPA ja NPA arvutati, kasutades võrdlusena koematerjali.

Märkus. PPV ja NPV arvutati, kasutades võrdlusena plasmat.

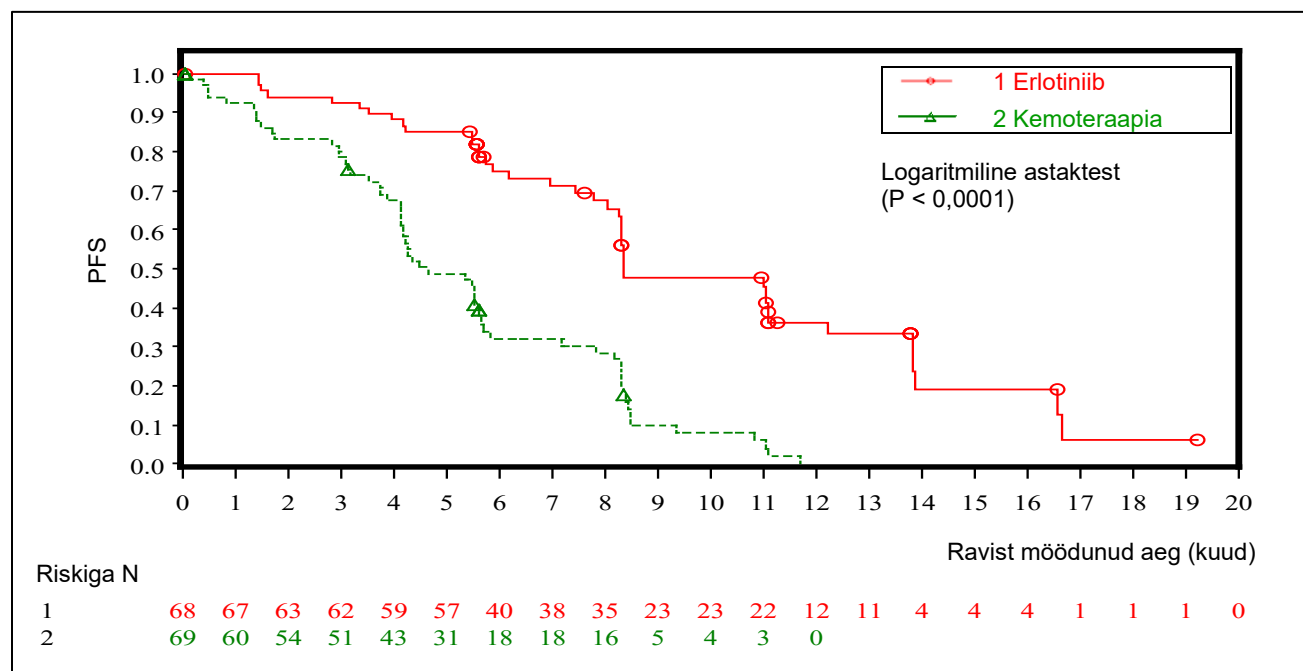
Plasma- ja koeproovide kokkulangevus on T790M resistentsusmutatsiooni puhul madalam kui aktiveerivate mutatsioonide puhul. PPA-d saab mõjutada koe heterogeensus: erinevalt aktiveerivatest mutatsioonidest L858R ja 19. eksoni deletsioonidest võib T790M sisalduda vaid vähestes kasvajakudedes, kuna enamasti on tegemist omandatud mutatsiooniga; seetõttu võib T790M-i tsirkuleeriva DNA (cfDNA) kontsentratsioon plasmas olla väga väike ja seega allpool tuvastamiskiiri. Kasvaja heterogeensus saab samuti NPA-d mõjutada, sest T790M mutatsioon ei pruugi esineda kõigis kasvajakudedes, võib juhtuda, et biopsia võetakse kasvajakoldest, milles T790M mutatsiooni ei ole, samal ajal võivad mõned teised kasvajakoldest olla T790-positiivsed.⁷

Kliinilise käigu andmed

ENSURE

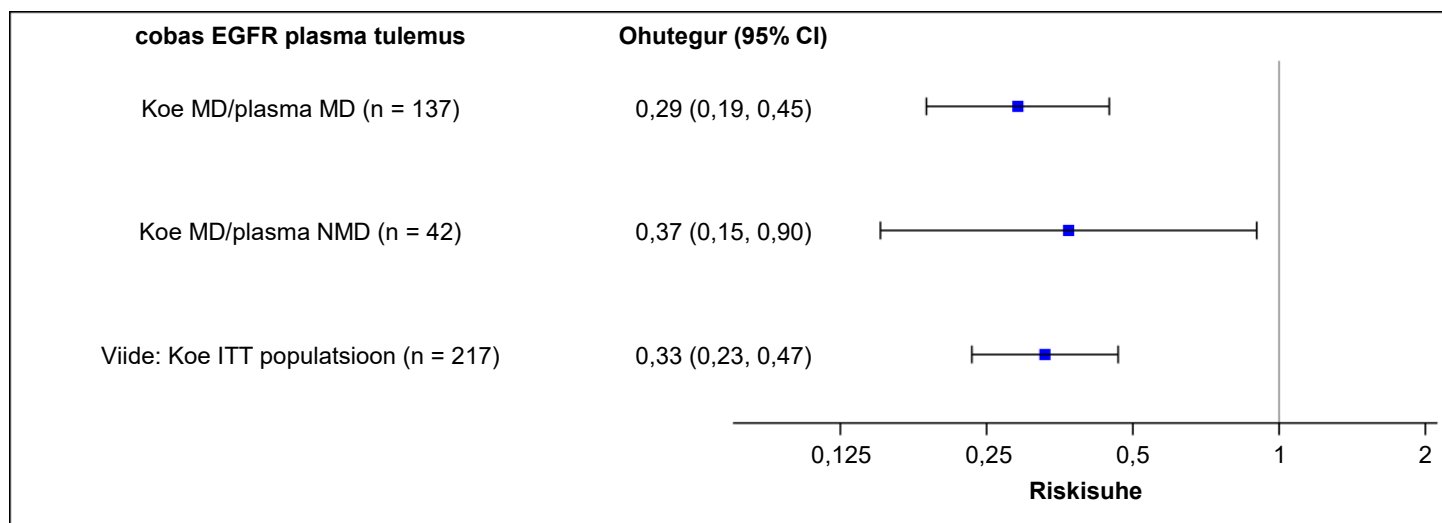
ENSURE'I uuringusse kaasatud 217 patsiendist (s.t need, kellel oli testi **cobas** EGFR v1 kohaselt tuvastatud koeproovis 19. eksoni deletsioon või L858R-mutatsioon) 214 (98,6%) K2 EDTA plasmaproov oli saadaval ja 180 patsiendi plasmaproovi maht oli 2,0 ml. Testi **cobas** EGFR poolt analüüsitud 180 plasmaproovist mahuga 2 ml oli 137 juhul 19. eksoni deletsiooni või L858R-mutatsiooni suhtes tulemus „Mutation Detected” (68 patsienti erlotiniibi rühmas, 69 patsienti kemoteraapia rühmas), 42 juhul oli tulemus „No Mutation Detected” (22 patsienti TARCEVA® rühmas, 20 patsienti kemoteraapia rühmas) ja ühe proovi tulemus oli kehtetu. Uurijapoolselt hinnatud progressioonivaba elumuse (PFS) Kaplan-Meieri kõverad plasmaproovis tuvastatud 19. eksoni deletsiooni või L858R mutatsiooniga patsientidel on näidatud Joonis 15. TARCEVA® rühma patsientide PFS oli kemoteraapia rühmaga võrreldes pikem ja kaks kõverat olid jälgimisperioodi vältel märgatavalt lahknevad (p väärtus < 0,001), mis näitab TARCEVA®-ravi olulist kasu plasmas tuvastatava EGFR-i aktiveeriva mutatsiooniga patsientidele.

Joonis 15 Kaplan-Meieri PFS diagramm cobas EGFR testiga nii plasma- kui ka koeproovides analüüsitud mutatsioonide kohta vastavalt ravile (uurijahinnang) (2 ml plasmaproovid)



Järjepidev kasulik mõju PFS-ile oli jälgitav kõigil 2,0 ml plasmaproovi mahuga EGFR mutatsioon-positiivsetel patsientidel nii negatiivse kui positiivse plasmamutatsiooni puhul. See kasulik mõju oli sarnane ENSURE ITT üldpopulatsioonis (ohutegur = 0,33; 95% CI: 0,23, 0,47) jälgitud kasuliku mõjuga, nagu näidatud Joonis 16 allpool.

Joonis 16 PFS-i ohuteguri uurijahinnangu blobogramm (2 ml plasmaproovidega)



Märkus. MD = Mutation Detected (19. eksoni deletsioon või L858R); NMD = No Mutation Detected (19. eksoni deletsioon või L858R)

AURA2

Esmane mõjusust väljendav uuritav tunnus oli objektiivne ravivastuse määr (ORR) RECIST 1.1 sõltumatu keskse pimeläbivaatuse tulemuste kohaselt, kasutades vastuse analüüsikomplekti hindamist. ORR määratleti kui ühe arstivisiidi teinud ja täisvastuse (CR) või osalise vastuse (PR) andnud patsientide arv (%), mis kinnitati vähemalt 4 nädalat hiljem (st kui CR-i või PR-i parim objektiivne vastus [BOR]).

Koe-hinnatava vastuse analüüsikomplekti (koe ERAS) kogumis (koeproovide T790M+ patsiendid testi cobas EGFR kohaselt, kes said vähemalt ühe annuse ravimit TAGRISSO® ja kellel oli baasjoonel mõõdetav haigusseisund BICR-i kohaselt) olid 111 patsienti cobas EGFR-testi kohaselt K2 EDTA plasma T790M+ (st T790M+ nii koe- kui ka plasmaproovides). ORR selle alamkogumi jaoks oli 64,9% (72/111, 95% CI: 52,1%, 70,4%), mis on väga lähedane koe ERAS-kogumis täheldatud 64,1%-ga.

Koe Full Analysis Set (FAS) kogumist (testi cobas EGFR kohaselt T790M+ patsiendid, kes said vähemalt ühe annuse ravimit TAGRISSO®) olid 117 patsienti testi cobas EGFR kohaselt plasma T790M+. ORR nii koe- kui ka plasmaproovide T790M tulemusega patsientide jaoks oli 61,5% (72/117, 95% CI: 55,2%, 73,7%), mis on samuti lähedane koe FAS kogumis täheldatud ORR-i 61%-le. Nende analüüsides tulemused on esitatud Tab. 41. Hõlmamine AURA2 programmi põhines positiivsetel koeproovi tulemustel, T790M plasma+, T790M tissue– patsientide testitulemused pole selle uuringu kohta saadaval.

Tab. 41 Objektiivne vastusmäär AURA2 uuringusse hõlmatud patsientide seas plasma tulemuse järgi (T790M+ koe järgi)

Kogum (T790M+ koeproovi järgi)	Testi cobas EGFR tulemused plasmaproovist	N	Vastusega patsientide arv (ORR) ^a n(%)	ORR (95% CI)
Koe täisanalüüsi komplekt (koe FAS)	T790M+ (plasma FAS)	117	72 (61,5%)	(55,2%, 73,7%)
	T790M–	89	53 (59,6%)	(51,3%, 73,0%)
	Üldine (koe FAS)	210	128 (61,0%)	(57,0%, 70,8%)
Koe hinnatava vastuse analüüsikomplekt (koe ERAS)	T790M+ (plasma ERAS)	111	72 (64,9%)	(52,1%, 70,4%)
	T790M–	83	52 (62,7%)	(48,6%, 69,8%)
	Üldine (koe ERAS)	198	127 (64,1%)	(54,0%, 67,6%)

^a Vastused hõlmavad vaid kinnitatud vastuseid.

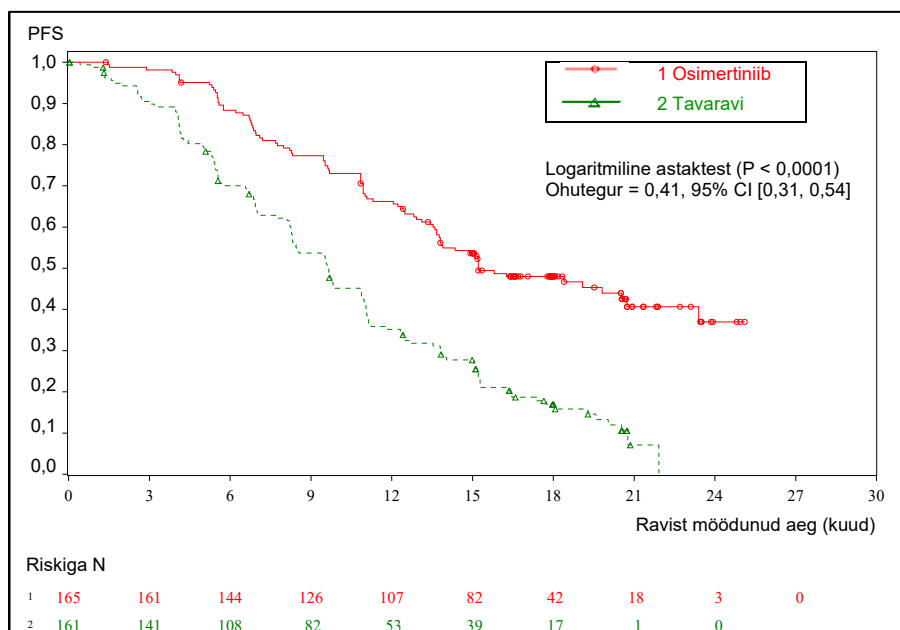
FLAURA

I. TAGRISSO® esmase rea III faasi uuring

FLAURA uuringus skriinita kokku 994 patsienti¹⁰ 556 patsienti randomiseeriti kliinilisse uuringusse ja 438 ei täitnud skriinimisel tingimusi. FLAURA uuringus randomiseeritud 556 patsiendist sobisid uuringuanalüüsi 537. Uuringusse sobivast 537 patsiendist randomiseeriti 276 tsentraalse cobas EGFR-i koetestiga, kellest 254 oli saadaval K2 EDTA plasmaproovi testimiseks, millest 190 olid positiivsed cobas EGFR-i plasmatestiga (pEGFRm+); 261 randomiseeriti lokaalse koetestiga, kellest 242 oli saadaval plasmaproovi testimiseks, millest 169 olid positiivsed cobas EGFR-i plasmatestiga (136 cobas koe EGFR-i mutatsioon positiivne (tEGFRm+), 1 cobas koe EGFR-i mutatsioon negatiivne (tEGFRm-) ja 32 kehtetut/mittetestitud cobas-koetestiga).

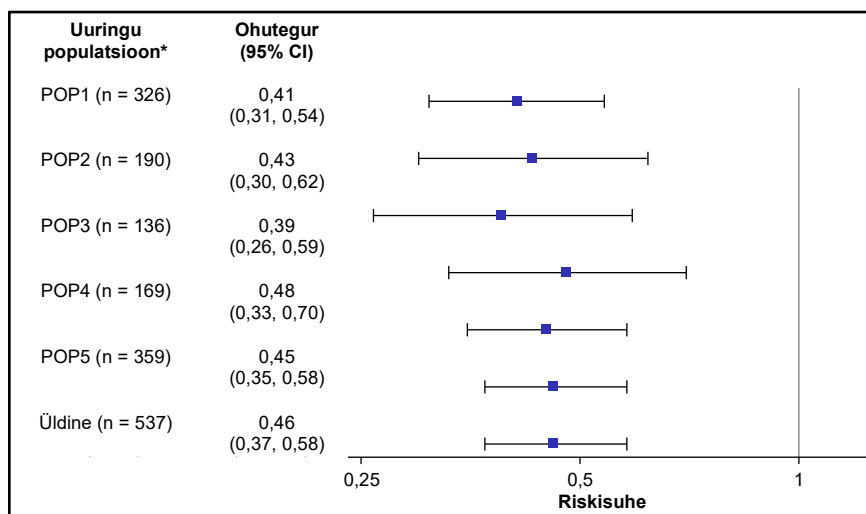
Plasma primaarpopulatsioonis (tEGFRm+ ja pEGFRm+ testiga cobas EGFR, N = 326, 190 randomeeriti tsentraalselt ja 136 randomeeriti lokaalselt) oli HR 0,41 (95% CI: 0,31, 0,54) ja FLAURA FAS (tEGFRm+, N = 556) HR oli 0,46 (95% CI: 0,37, 0,58). Seega on plasma primaarpopulatsiooni ravimi efektiivsus võrreldav FLAURA FAS-populatsiooniga. Plasma primaarpopulatsiooni Kaplan-Meieri graafik kas 19. eksoni deletsiooniga või L858R-mutatsiooniga plasmaproovis on toodud Joonis 17.

Joonis 17 PFS-i Kaplan-Meieri graafik FLAURA plasma primaarpopulatsiooni ravis (patsiendid, kes olid cobas tEGFRm+ ja cobas pEGFRm+, n = 326)



TAGRISSO® üleolek tavaravi suhtes oli ühtlane kõikides plasmapositiivsetes alagruppides, mis määrati lokaalse ja tsentraalse cobas tEGFR-i kaasamisstaatusena, kus HR-i vahemik oli 0,39 kuni 0,48 ning vastas FLAURA FAS-populatsiooniga saadud HR-ile (HR = 0,46), nagu on näidatud Joonis 18 all.

Joonis 18 FLAURA alagruppide, mis on määratud lokaalse ja tsentraalse cobas EGFR-i testistaatusena, HR-ide Foresti graafik



POP = populatsioon (alagrupp)

* POP1: kõik randomiseeritud patsiendid, kellel oli positiivne cobas-koetest ja cobas-plasmatest.

POP2: patsiendid, kes randomiseeriti cobas-koetesti alusel ja kes olid positiivsed cobas-plasmatestiga.

POP3: patsiendid, kes randomiseeriti lokaalse koetesti alusel ja kes olid positiivsed cobas-koe- ja -plasmatestiga.

POP4: patsiendid, kes randomiseeriti lokaalse koetesti alusel ja kes olid positiivsed cobas-plasmatestiga.

POP5: kõik randomiseeritud patsiendid, kellel oli positiivne cobas-plasmatest.

Üldine: kõik randomiseeritud patsiendid, välja arvatud 19 Hiina patsienti.

tFAS: kõik randomiseeritud patsiendid (FLAURA täisanalüüsi rühm).

II. IRESSA® tavaravi analüüs

Tavaravi kogumi patsientidele, kes said IRESSA®-ravi (gefitiniib), tehti eraldi analüüs. Kõikidest IRESSA®-ravi saanud patsientidest, kellel oli uurija hinnatud objektiivne ravivastus FLAURA uuringus, oli 105 patsiendil **cobas**-plasmatest K2 EDTA proovidest positiivne. ORR kõikidel **cobas**-plasma positiivsetel patsientidel oli 71,4% (75/105, 95% CI: 62,2%, 79,2%, POP4 Tab. 42).

Nendest 105 patsiendist, kellel oli **cobas**-plasmatest positiivne, randomiseeriti **cobas**-koetestiga 47 patsienti (**cobas**-plasmatesti primaarne efektiivsuspopulatsioon) ja 58 patsienti randomiseeriti lokaalse testiga. Kokku hinnati uurija hinnangu alusel vastajaks 36 patsienti **cobas**-plasmatesti primaarsest efektiivsuspopulatsioonist (n = 47), mis andis ORR 76,6% (95% CI: 62,8%, 86,4%, POP1 Tab. 42).

ORR oli 62,2% (28/45, 95% CI: 47,6%, 74,9%) lokaalselt randomiseeritud patsientidel, kes andsid positiivsed tulemused nii **cobas**-koe- kui ka **cobas**-plasmatega (POP2 Tab. 42). ORR oli 69,6% (64/92, 95% CI: 59,5%, 78,0%) kõikidel IRESSA® ravi saanud patsientidel, kes andsid positiivsed tulemused nii **cobas**-koe- kui ka **cobas**-plasmatega (POP3 Tab. 42). Nende erinevate patsiendipopulatsioonide ORR-ide Foresti graafik on toodud Joonis 19. Tulemused viitavad, et IRESSA® raviefekt **cobas**-plasmatega tagati igas alamgrupis ning need olid sarnased algse registreerimisuurinuga (IFUM) patsientidel, kes valiti IRESSA®-ravi saada.¹³

Tab. 42 cobas-plasma positiivsete IRESSA®-ravi saanud patsientide ORR-id FLAURA uuringus

Objektiivne ravivastus	Plasma positiivsed (pEGFR+) patsiendid tavaravi rühmas, keda raviti IRESSA®-ga				
	pEGFR+ tsentraalselt randomiseeritud (cobas tEGFR+)	pEGFR+ lokaalselt randomiseeritud (lokaalne tEGFR+)			Kokku
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Kehtetu / ei testitud	
Patsientide arv	47	45	1	12	105
Vastus	36	28	1	10	75
Vastus puudub	11	17	0	2	30
ORR (% , 95% CI)	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%)		-	-	-

Märkus: tEGFR = koe EGFR; pEGFR = plasma EGFR; CI (skoor) usaldusvahemik.

POP = populatsioon (alagrupp)

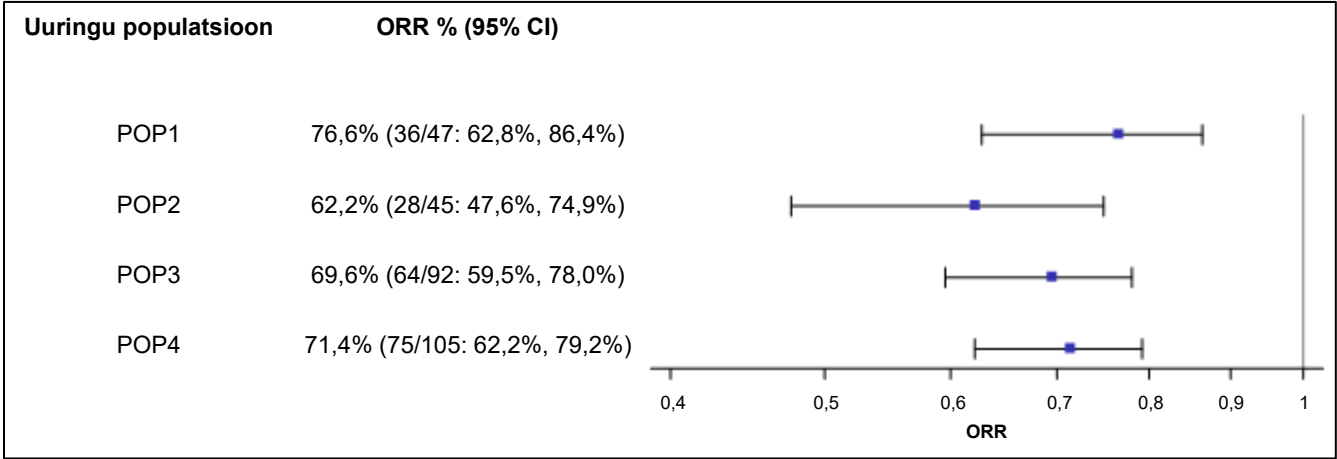
POP1: **cobas**-koetestiga randomiseeritud **cobas** pEGFR+-patsientide ORR (primaarne efektiivsuspopulatsioon **cobas**-plasmatega).

POP2: **cobas** plasma- ja koetestiga positiivsete patsientide, kes randomiseeriti lokaalse koetestiga, ORR.

POP3: kõikide **cobas**-plasma- ja -koetestidega positiivsete patsientide ORR.

POP4: kõikide **cobas**-plasmatega positiivsete patsientide ORR.

Joonis 19 Foresti graafikud ORR-ides, põhinedes cobas EGFR-i plasmatestil erinevates populatsioonides



POP = populatsioon (alagrupp)
POP1: **cobas**-koetestiga randomiseeritud **cobas** pEGFR+-patsientide ORR (primaarne efektiivsuspopulatsioon **cobas**-plasmatestiga).
POP2: **cobas** plasma- ja koetestiga positiivsete patsientide, kes randomiseeriti lokaalse koetestiga, ORR.
POP3: kõikide **cobas**-plasma- ja -koetestidega positiivsete patsientide ORR.
POP4: kõikide **cobas**-plasmatestiga positiivsete patsientide ORR.

Tulemuste lipud

Tulemuste lippude seletus

Lipu kood viitab lipu allikale, täpsema teabe jaoks vt Tab. 43.

Tab. 43 Lipu allikas

Lipu koodi algus on	Lipu allikas	Näide
M ^a	Mitmed või teised põhjused	M6
R	Tulemuse tõlgendamine	R20
Z ^a	Analüsaator	Z1

^a Vt süsteemi cobas® 4800 kasutaja käsiraamatut või süsteemi cobas® 4800 kasutajaabi

Tab. 44 toob välja kõik süsteemi tulemuste lipud, mis on kasutajale olulised.

Tab. 44 Tulemuste tõlgendamise lippude loend

Lipukood	Raskusaste	Kirjeldus	Soovitav tegevus
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Tõrge	Sihtmärki ei tuvastatud	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et proovis saadi negatiivne vastus (s.t proovi ei pruugitud lisada ühte või mitmesse auku).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Tõrge	Mutatsioonikontrolli ei tuvastatud	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et käänukoha määramise algoritmis esines tõrge. Sellised tõrked võivad esineda ebatüüpilise või müraga fluorestseeruva signaali korral.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Tõrge	Mutatsioonikontrolli ei tuvastatud	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et mutatsioonikontrollil oli negatiivne tulemus. Ühte või mitmesse auku ei ole lisatud mutatsioonikontrolli DNA-d.
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Tõrge	Mutatsioonikontroll on väljaspool vahemikku	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Lipukoodid näitavad, et mutatsioonikontrolli Ct-väärtus oli üle kehtestatud piirväärtuse (st käänukoht liiga kõrgel). Selle põhjuseks võib olla: 1. Tööpõhise ebarõhke valmistamine. 2. Pipettimisviga mikrotiiterplaadile tööpõhise lisamisel. 3. Pipettimisviga mikrotiiterplaadi aukudesse mutatsioonikontrolli lisamisel.
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Tõrge	Mutatsioonikontroll on väljaspool vahemikku	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Lipukoodid näitavad, et mutatsioonikontrolli Ct-väärtus oli kehtestatud piirväärtusest madalam (st käänukoht liiga madalal). Selline viga võib esineda DNA saastuse korral.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Tõrge	Negatiivset kontrolli ei tuvastatud	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et käänukoha määramise algoritmis esines tõrge. Sellised tõrked võivad esineda ebatüüpilise või müraga fluorestseeruva signaali korral.
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Tõrge	Negatiivne kontroll on väljaspool vahemikku	Korrake katseseeriat. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et negatiivse kontrolli tulemus oli positiivne (st toimunud on saastus).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Tõrge	Sihtmärki ei tuvastatud	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et käänukoha määramise algoritmis esines tõrge. Sellised tõrked võivad esineda ebatüüpilise või müraga fluorestseeruva signaali korral.

Lipukood	Raskusaste	Kirjeldus	Soovitav tegevus
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Tõrge	Tulemus jääb väljapoole vahemikku	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et proovi Ct väärtus oli ebatüüpiliselt madal.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Tõrge	Tulemus jääb väljapoole vahemikku	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et mutatsiooni Ct-väärtuse ja sisemise kontrolli Ct-väärtuse vahel leiti proovis ebatüüpiline suhe.
R811, R831, R851	Tõrge	Sisemist kontrolli ei tuvastatud	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Vastavad lipukoodid näitavad, et käänukoha määramise algoritm esines tõrge. Sellised tõrked võivad esineda ebatüüpilise või müraga fluorestseeruva signaali korral.
R812, R832, R852	Tõrge	Sisemist kontrolli ei tuvastatud	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et proovi sisemise kontrolli tulemus oli kehtetu. Kehtiva sisemise kontrolli väärtuse puudumine näitab järgmist. 1. Proovi genoomse DNA halb kvaliteet. 2. Viga proovi töötlemisel. 3. Proov sisaldab PCR-i inhibiitoreid. 4. Genoomse DNA sisemise kontrolli praimerite ja/või sondide seondumise piirkondades esinevad haruldased mutatsioonid 5. Ühte või mitmesse auku ei ole lisatud proovi DNA-d. 6. Muud faktorid.
R813, R834, R853	Tõrge	Sisemine kontroll väljaspool vahemikku	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et proovi sisemise kontrolli tulemus oli kehtetu. Kehtiva sisemise kontrolli väärtuse puudumine näitab järgmist. 1. Proovi genoomse DNA halb kvaliteet. 2. Viga proovi töötlemisel. 3. Proov sisaldab PCR-i inhibiitoreid. 4. Genoomse DNA sisemise kontrolli praimerite ja/või sondide seondumise piirkondades esinevad haruldased mutatsioonid 5. Ühte või mitmesse auku ei ole lisatud proovi DNA-d. 6. Muud faktorid.
R814, R835, R854	Tõrge	Sisemine kontroll väljaspool vahemikku	Korrake proovi analüüsi. Vaadake jaotist Testiprotseduur . Need lipukoodid näitavad, et proovi sisemise kontrolli Ct-väärtus oli ebatüüpiliselt väike. See viga võib tekkida, kui PCR-segu laaditakse üle kontsentreeritud genoomse DNA-ga.

Lisateave

Sümbolid

Roche'i PCR diagnostikatoodete märgistamisel kasutatakse järgmisi sümboleid.

Tabel 45 Roche'i PCR diagnostikatoodete märgistamisel kasutatavad sümbolid

Age/DOB	Vanus või sünniaeg		Seade, mis ei ole ettenähtud patsiendi lähedal testimiseks	QS IU/PCR	QS IU PCR-reaktsiooni kohta, kasutage tulemuste arvutamisel QS rahvusvahelisi ühikuid (IU) PCR-reaktsiooni kohta.
	Lisatarkvara		Seade, mis ei ole ettenähtud enesetestimiseks	SN	Seerianumber
Assigned Range [copies/mL]	Etteantud vahemik (koopiat/ml)		Edasimüüja (Märkus. Sümboli all võib olla määratletud vastav riik/piirkond.)	Site	Uuringukoht
Assigned Range [IU/mL]	Etteantud vahemik (IU/ml)		Mitte korduskasutada	Procedure Standard	Standardne protseduur
EC REP	Volitatud esindaja Euroopa Ühenduses		Naine	STERILE EO	Steriliseeritud etüleenoksiidi kasutades
BARCODE	Võõtkoodi andmeleht		Ainult IVD toimivuse hindamiseks		Hoida pimedas
LOT	Partii number	GTIN	Globaalne kaubaartikli kood		Temperatuuripiir
	Biooloogilised riskid		Maaletooja		Katsekirjeldusfail
REF	Tootekood	IVD	Meditsiiniline <i>in vitro</i> diagnostikavahend		Siit üles
	CE-vastavusmärgis; see seade vastab meditsiinilisele <i>in vitro</i> diagnostika-vahendile kohaldatavatele CE-märgise nõuetele.	LLR	Määratud vahemiku alampiir	Procedure UltraSensitive	Ülitundlik meetod
Collect Date	Kogumise kuupäev		Mees	UDI	Seadme unikaalne identifikaator
	Enne kasutamist lugege juhendit		Tootja	ULR	Määratud vahemiku ülempiir
	Piisab <n> testiks	CONTROL -	Negatiivne kontroll	Urine Fill Line	Uriini täitejoon
CONTENT	Komplekti sisu		Mittesteriilne	Rx Only	Ainult USA-s: seadet on föderaalseaduste alusel lubatud müüa ainult arstile või arsti tellimusel.
CONTROL	Kontroll		Patsiendi nimi		Kasutustähtaeg
	Tootmiskuupäev		Patsiendi number		
	Seade, mis on ettenähtud patsiendi lähedal testimiseks		Rebiges siit		
	Seade enesetestimiseks	CONTROL +	Positiivne kontroll		
		QS copies / PCR	QS koopiat PCR-reaktsiooni kohta, kasutage tulemuste arvutamisel QS koopiaid PCR-reaktsiooni kohta.		

Tehniline tugi

Tehnilise toe (abi) saamiseks pöörduge palun oma kohaliku sidusettevõtte poole:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Tootja

Tabel 46 Tootja

Toodetud USAs



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

Tehtud USAs

Kaubamärgid ja patendid

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

Autoriõigus

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.

Viited

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 (EORTAC): 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.

Dokumendi redaktsioon

Dokumendi redaktsiooniteave	
Doc Rev. 8.0 07/2023	Jaotis A ja Jaotis B jaotist Vajalikud seadmed ja tarkvara, mida kaasas ei ole uuendati süsteemitarkvara versioonile 2.2 ja lisati viide toote infolehele. Värskendatud cobas® kaubamärk. Uuendatud jaotus Kaubamärgid ja patendid , sh link. Küsimuste tekkimise korral võtke ühendust Roche'i kohaliku esindajaga.