

cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Do stosowania w diagnostyce in vitro



cobas[®] EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

Szczegółowe informacje na temat przygotowywania próbek FFPE podano w sekcji **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190).

Szczegółowe informacje na temat przygotowywania próbek osocza podano w sekcji **cobas[®] DNA Sample Preparation Kit** (M/N 07247737190).

SPIS TREŚCI

Zastosowanie	6
Podsumowanie oraz objaśnienie testu	7
Informacje podstawowe	7
Zasady procedury	9
Przygotowanie próbek	9
Amplifikacja PCR	9
CZĘŚĆ A: DO STOSOWANIA Z PRÓBKAMI TKANKI	11
Materiały i odczynniki	11
Dostarczone materiały i odczynniki	11
Przechowywanie i użytkowanie odczynników	12
Wymagane materiały dodatkowe	13
Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane	13
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	14
Ostrzeżenia i środki ostrożności	14
Dobra praktyka laboratoryjna	14
Zanieczyszczenie	14
Integralność	15
Utylizacja	15
Rozlanie płynów i czyszczenie	15
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	15
Pobieranie próbki	15
Transport, przechowywanie i stabilność próbek	15
Przechowywanie i stabilność próbki przetworzonej	16
Procedura testowa	17
Wykonywanie oznaczenia	17
Instrukcja użytkowania	17
Wielkość przebiegu	17
Kontrola całego procesu	17
Izolacja DNA	18
Przecięcie makroskopowe	18
Ocena ilościowa stężenia DNA	18
Amplifikacja i detekcja	19
Konfiguracja aparatu	19
Konfiguracja zlecenia testu	19
Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbki	20
Rozcieńczenie próbki	21

Konfiguracja reakcji.....	21
Rozpoczęcie reakcji PCR.....	23
Wyniki.....	23
Interpretacja wyników	23
Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami.....	24
Kontrola jakości i ważność wyników	24
Kontrola mutacji	24
Kontrola ujemna	24
Ograniczenia metody	24
Niekliniczna ocena wiarygodności.....	25
Czułość analityczna — granica ślepej próby	25
Granica wykrywalności przy użyciu mieszanek próbek FFPET.....	26
Minimalna zawartość tkanki guza.....	28
Reaktywność krzyżowa z innym mutacjami w eksonach 18, 19, 20 i 21	29
Próbki badania klinicznego EURTAC	29
Próbki badania klinicznego AURA2.....	29
Swoistość — mikroorganizmy i homologi EGFR	29
Mikroorganizmy związane z płucami	29
Plazmidy homologów EGFR	29
Substancje wpływające na wynik testu	30
Tkanka martwicza.....	30
Powtarzalność	30
Odtwarzalność przygotowywania próbek	30
Ocena klinicznej skuteczności testu.....	31
Badanie powtarzalności klinicznej 1.....	31
Badanie powtarzalności klinicznej 2.....	32
Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki fazy III z badania EURTAC.....	33
Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki z badania fazy II AURA2.....	36
Dane dotyczące wyniku klinicznego.....	37
EURTAC	37
AURA2	38
FLAURA	39

CZĘŚĆ B: DO STOSOWANIA Z PRÓBKAMI OSOCZA.....	44
Przygotowanie próbek.....	44
Materiały i odczynniki	44
Dostarczone materiały i odczynniki.....	44
Przechowywanie i użytkowanie odczynników	45
Wymagane materiały dodatkowe.....	46
Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane	46
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	47
Ostrzeżenia i środki ostrożności	47
Dobra praktyka laboratoryjna	47
Zanieczyszczenie	47
Integralność.....	48
Utylizacja	48
Rozlanie płynów i czyszczenie	48
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	49
Pobieranie próbek i praca z próbkami.....	49
Transport, przechowywanie i stabilność próbek	49
Przechowywanie i stabilność próbki przetworzonej	49
Procedura testowa	50
Wykonywanie oznaczenia	50
Instrukcja użytkowania	50
Wielkość przebiegu.....	50
Kontrola całego procesu	50
Izolacja DNA	50
Amplifikacja i detekcja.....	51
Konfigurowanie aparatu.....	51
Konfiguracja zlecenia testu.....	51
Konfiguracja reakcji.....	52
Rozpoczęcie reakcji PCR.....	54
Wyniki.....	54
Interpretacja wyników	54
Wskaźnik półilościowy (SQI).....	55
Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami.....	55
Kontrola jakości i ważność wyników	55
Kontrola mutacji	55
Kontrola ujemna	55
Ograniczenia metody	55

Niekliniczna ocena wiarygodności.....	57
Skuteczność analityczna	57
Czułość analityczna — granica ślepej próby	57
Granica wykrywalności przy użyciu DNA linii komórkowych.....	57
Reaktywność krzyżowa z innymi mutacjami w eksonach 18, 19, 20 i 21	58
Próbki z przedłużenia badania AURA oraz badania klinicznego AURA2	58
Swoistość — mikroorganizm.....	58
Substancje wpływające na wynik testu.....	58
Liniowość	59
Powtarzalność	62
Ocena klinicznej skuteczności testu.....	63
Powtarzalność kliniczna z osoczem pobranym na K2 EDTA.....	63
Powtarzalność kliniczna z osoczem pobranym do probówki Roche cfDNA.....	64
Granica wykrywalności (LoD) przy użyciu próbek osocza NSCLC	65
Korelacja osocza pobranego do probówki Roche cfDNA z osoczem pobranym na K2 EDTA	66
Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki osocza z kohorty badania fazy III ASPIRATION....	67
Korelacja między próbkami osocza i tkanki wg testu cobas EGFR Test pod względem wykrywania delekcji w eksonie 19 i L858R przy użyciu próbek z badania fazy III ENSURE	68
Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki z badania fazy II AURA2.....	69
Korelacja między próbkami osocza i tkanki w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M przy użyciu próbek z badania fazy II AURA2	71
Dane dotyczące wyniku klinicznego.....	72
ENSURE.....	72
AURA2	73
FLAURA	74
Flagi wyników	78
Objaśnienie flag wyników	78
Dodatkowe informacje	80
Oznaczenia.....	80
Pomoc techniczna	81
Wytwórca.....	81
Znaki towarowe i patenty.....	81
Prawo autorskie.....	81
Piśmiennictwo.....	82
Wersja dokumentu	84

Zastosowanie

Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 jest oparty na reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przeznaczony do jakościowej detekcji zdefiniowanych mutacji w genie kodującym receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (ang. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC). Zdefiniowane mutacje w genie EGFR są wykrywane przy użyciu DNA izolowanego z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (ang. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumor Tissue*, FFPET) próbek tkanki nowotworowej lub wolnego DNA komórek nowotworowych znajdującego się w krwiobiegu (ang. *Circulating-Free Tumor DNA*, cfDNA) z osocza pozyskiwanego z obwodowej krwi pełnej pobranej na EDTA jako antykoagulant.

Test jest przeznaczony do dodatkowej diagnostyki wspomagającej dobór pacjentów z NSCLC do leczenia za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR (w tym terapii celowanych, które zawiera Tabela 1 poniżej) zgodnie z zatwierdzonym wskazaniem terapeutycznym produktu:

Tabela 1

Lek	FFPET	Osocze
TARCEVA® (erlotynib)	Delecje w eksonie 19 i mutacja L858R	Delecje w eksonie 19 i mutacja L858R
TAGRISSO® (ozymertynib)	Delecje w eksonie 19, mutacja L858R i T790M	Delecje w eksonie 19, mutacja L858R i T790M
IRESSA® (gefitynib)	Delecje w eksonie 19 i mutacja L858R	Delecje w eksonie 19 i mutacja L858R

Badanie próbek osocza jest najbardziej odpowiednie w przypadku pacjentów, od których nie można uzyskać biopsji tkanki nowotworowej. Pacjenci, u których nie stwierdzono tych mutacji w teście używanym z próbkami osocza, powinni zostać skierowani na rutynowe badanie biopsyjne i badanie w kierunku mutacji w genie EGFR z wykorzystaniem próbki FFPET, jeżeli jest dostępne.

Bezpieczeństwo i skuteczność leku nie zostały ustalone dla następujących mutacji w genie EGFR wykrywanych za pomocą testu **cobas**® EGFR Mutation Test v2:

Tabela 2

Lek	FFPET	Osocze
TARCEVA® (erlotynib)	G719X, insercje w eksonie 20, T790M, S768I i L861Q	G719X, insercje w eksonie 20, T790M, S768I i L861Q
TAGRISSO® (ozymertynib)	G719X, insercje w eksonie 20, S768I i L861Q	G719X, insercje w eksonie 20, S768I i L861Q
IRESSA® (gefitynib)	G719X, insercje w eksonie 20, T790M, S768I i L861Q	G719X, insercje w eksonie 20, T790M, S768I i L861Q

Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 przeznaczony do stosowania z próbkami osocza obejmuje półilościowe oznaczanie mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR. To oznaczenie, zgłaszane jako wskaźnik półilościowy (SQI), koreluje z ilością docelowego zmutowanego cfDNA w osoczu i można go używać w celu określenia zmian w ilości docelowego zmutowanego cfDNA w funkcji czasu dla danego pacjenta.

W przypadku ręcznego przygotowywania próbek próbki FFPET są przetwarzane przy użyciu zestawu **cobas**® DNA Sample Preparation Kit, a próbki osocza są przetwarzane przy użyciu zestawu **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit. Analizator **cobas** z 480 służy do automatycznej amplifikacji i detekcji.

Podsumowanie oraz objaśnienie testu

Informacje podstawowe

Uaktywnienie się mutacji genu kodującego EGFR następuje głównie w przypadku NSCLC i skutkuje konstytutywną aktywacją białka EGFR, które wykazuje aktywność kinazy, przyczyniając się tym samym do rozwoju procesu onkogenego.¹ Częstość występowania tych mutacji w niewyselekcjonowanych przypadkach NSCLC wynosi około 10–30%.^{2, 3} Jednak mutacje te występują częściej (choć nie wyłącznie) u niepalących/rzadko palących pacjentek pochodzenia azjatyckiego, u których w badaniach histopatologicznych wykrywa się gruczolakoraka.⁴

Najczęstsze mutacje w genie EGFR w przypadku NSCLC to różne delecje w eksonie 19 i substytucja L858R w eksonie 21. Mutacje te stanowią łącznie około 85% mutacji w genie EGFR obserwowanych w przebiegu NSCLC.⁵ Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (**cobas** EGFR Test) to test reakcji PCR zachodzącej w czasie rzeczywistym opracowany do wykrywania substytucji G719X w eksonie 18, delecji w eksonie 19, substytucji T790M i S768I w eksonie 20, insercji w eksonie 20 i substytucji L858R oraz L861Q w eksonie 21.

Test **cobas** EGFR Test to dodatkowy test diagnostyczny w przypadku leczenia produktem leczniczym TARCEVA® (erlotynib), związkiem, który w odwracalny sposób hamuje aktywność kinazy EGFR, zapobiegając autofosforylacji reszt tyrozynowych związanych z receptorem i tym samym hamując dalsze przekazywanie sygnału, które stymuluje przeżycie i proliferację komórek. Powinowactwo wiązania TARCEVA® do receptora z delecją w eksonie 19 lub mutacją L858R w eksonie 21 genu EGFR jest wyższe niż powinowactwo w przypadku receptora bez mutacji.⁶ W badaniach klinicznych wykazano, że pacjenci z zaawansowanym NSCLC i delecją w eksonie 19 lub substytucją w eksonie 21 L858R leczeni w ramach leczenia pierwszego rzutu produktem leczniczym TARCEVA® mogą odnieść korzyści kliniczne w porównaniu z pacjentami poddawany chemioterapii.^{3, 7}

Test **cobas** EGFR Test to dodatkowy test diagnostyczny w przypadku leczenia produktem leczniczym TAGRISSO® (ozymertynib), nieodwracalnym inhibitorem EGFR obciążonego mutacjami uwrażliwiającymi na działanie TKI, jak i mutacjami T790M prowadzącymi do oporności w przebiegu zaawansowanego NSCLC. Produkt leczniczy TAGRISSO® hamuje aktywność kinazy EGFR, co prowadzi do zahamowania kaskady dalszych zdarzeń sygnałowych we wnętrzu komórki, które stymulują proliferację i przeżycie komórek, a także angiogenezę.⁸ W badaniach klinicznych wykazano, że pacjenci z zaawansowanym niepłaskonabłonkowym NSCLC i z mutacją w genie EGFR uwrażliwiającą na działanie TKI, u których doszło do progresji choroby po leczeniu z użyciem TKI EGFR pierwszej generacji, a także pacjenci, u których wystąpiła mutacja T790M w eksonie 20 prowadząca do oporności, mogą odnieść korzyści kliniczne z leczenia produktem leczniczym TAGRISSO®.⁹ W badaniu klinicznym fazy III wykazano, że pacjenci z zaawansowanym NSCLC (z delecją w eksonie 19 lub mutacją substytucji L858R w eksonie 21) leczeni produktem leczniczym TAGRISSO® w ramach leczenia pierwszego rzutu uzyskali większe korzyści kliniczne w porównaniu do pacjentów leczonych TKI EGFR pierwszej generacji (gefitynib lub erlotynib).¹⁰

Test **cobas** EGFR Test to dodatkowy test diagnostyczny w przypadku leczenia produktem leczniczym IRESSA® (gefitynib), związkiem, który w odwracalny sposób hamuje aktywność kinazy EGFR, zapobiegając autofosforylacji reszt tyrozynowych związanych z receptorem i tym samym hamując dalsze przekazywanie sygnału, które stymuluje przeżycie i proliferację komórek. W badaniach klinicznych wykazano, że pacjenci z zaawansowanym NSCLC i delecją w eksonie 19 lub substytucją w eksonie 21 L858R leczeni w ramach leczenia pierwszego rzutu produktem leczniczym IRESSA® mogą odnieść korzyści kliniczne w porównaniu z pacjentami poddawany chemioterapii.^{11, 12, 13}

Tabela 3 wymienia mutacje EGFR wykrywane za pomocą testu **cobas** EGFR.

Tabela 3 Test cobas EGFR jest przeznaczony do detekcji następujących mutacji

Ekson	Grupa mutacji EGFR	Sekwencja kwasu nukleinowego genu kodującego EGFR	Nomenklatura białek wg HGVS*	Nomenklatura nukleotydów wg HGVS*	Identyfikator COSMIC ¹⁴
Ekson 18	G719X	2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)	LRG_304t1:c.2156G>C	6239
		2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)	LRG_304t1:c.2155G>A	6252
		2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)	LRG_304t1:c.2155G>T	6253
Ekson 19	Ex19Del	2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_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
Ekson 20	S768I	2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)	LRG_304t1:c.2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)	LRG_304t1:c.2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9 GCCAGCGTG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	12377
		2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9 GCGTGGACA	LRG_304p1:p.(Ser768_Asp770dup)	LRG_304t1:c.2303_2311dupGCGTGGACA	13428
		2309_2310AC> CCAGCGTGGAT	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT	13558
Ekson 21	L858R	2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT	12429
	L861Q	2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)	LRG_304t1:c.2582T>A	6213

* HGVS — ang. Human Genome Variation Society

Zasady procedury

Test **cobas** EGFR jest oparty na dwóch głównych procesach: (1) ręcznym przygotowaniu próbki w celu pozyskania DNA z próbek FFPET lub osocza oraz (2) amplifikacji PCR i detekcji docelowego DNA z użyciem komplementarnych par primerów oraz znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych. Test **cobas** EGFR jest przeznaczony do detekcji następujących mutacji:

- Ekson 18: G719X (G719A, G719C i G719S)
- Ekson 19: delecje i mutacje złożone (definiowane jako równoczesne wystąpienie delecji i insercji)
- Ekson 20: S768I, T790M i insercje
- Ekson 21: L858R i L861Q

Detekcję mutacji uzyskuje się w toku analizy PCR za pomocą analizatora **cobas z 480**. Do każdego przebiegu testowego włącza się kontrolę mutacji oraz kontrolę ujemną w celu potwierdzenia ważności przebiegu.

Przygotowanie próbek

Zestawy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit oraz **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit to zestawy do ręcznego przygotowywania próbek z wykorzystaniem odpowiednio FFPET i osocza, oparte na wiązaniu kwasu nukleinowego do włókien szklanych. Proteaza i chaotropowy bufor do lizy/wiążący uwalnia kwasy nukleinowe i chroni uwolniony DNA przed DNazami. W dalszej kolejności do mieszaniny, w której dokonano lizy, dodaje się izopropanol, po czym mieszaninę wiruje się i przepuszcza przez kolumnę z wkładem filtrującym, zawierającym włókna szklane. W trakcie wirowania DNA ulega związaniu na powierzchni włókien szklanych filtra. Substancje niezwiązane, takie jak sole, białka i inne zanieczyszczenia pochodzenia komórkowego, zostają usunięte w wyniku wirowania. Związane kwasy nukleinowe są przemycane i poddane elucji roztworem wodnym. Następnie docelowy DNA amplifikuje się i poddaje detekcji w analizatorze **cobas z 480** z użyciem odczynników do amplifikacji i detekcji, dostarczanych wraz z zestawem **cobas** EGFR Test.

Amplifikacja PCR

Wybór sekwencji docelowej

W teście **cobas** EGFR wykorzystuje się primery określające specyficzne sekwencje par zasad każdej z mutacji docelowych. W przypadku delecji w eksonie 19 sekwencje docelowe mają długość od 125 do 141 par zasad; w przypadku substytucji L858R w eksonie 21 sekwencja docelowa ma długość 138 par zasad; w przypadku substytucji T790M w eksonie 20 sekwencja docelowa ma długość 118 par zasad; w przypadku substytucji G719X w eksonie 18 sekwencje docelowe mają długość 104–106 par zasad; w przypadku substytucji S768I w eksonie 20 sekwencja docelowa ma długość 133 par zasad; w przypadku insercji w eksonie 20 sekwencje docelowe mają długość od 125 do 143 par zasad; w przypadku substytucji L861Q w eksonie 21 sekwencja docelowa ma długość 129 par zasad. Amplifikacja zachodzi jedynie w regionach genu kodującego EGFR między primerami; całość genu kodującego EGFR nie ulega amplifikacji.

Amplifikacja sekwencji docelowej

Do amplifikacji sekwencji docelowej wykorzystuje się polimerazę DNA Z05-AS1 pochodzącą z gatunku *Thermus*. Mieszanina PCR jest najpierw podgrzewana w celu denaturacji DNA oraz odsłonięcia sekwencji docelowych primerów. W miarę ochładzania się mieszaniny startery wiodące i odwrotne hybrydują z docelowymi sekwencjami DNA. Polimeraza DNA Z05 w obecności kationu dwuwartościowego metalu oraz nadmiaru dezoksyrybonukleotydów (dNTP) wydłuża każdy przyłączony w wyniku hybrydyzacji primer i w ten sposób następuje synteza drugiej nici DNA. Proces ten kończy pierwszy cykl PCR, dostarczając dwuniciowej kopii DNA, zawierającej regiony genu kodującego EGFR z docelowymi sekwencjami par zasad. Proces ten powtarza się wielokrotnie, przy czym w każdym z cykli ilość docelowego DNA (amplikonu) ulega podwojeniu.

Zautomatyzowana detekcja mutacji w czasie rzeczywistym

Test **cobas** EGFR wykorzystuje technologię PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*). W tej reakcji każda swoista dla sekwencji docelowej sonda oligonukleotydowa jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym, służącym jako reporter, a także cząsteczką pełniącą funkcję wygaszacza absorbującego (wygaszającego) emisję fluorescencji pochodzącą z barwnika reporterowego w nienaruszonej sondzie. W trakcie każdego cyklu amplifikacji służąca do sekwencji jednociowego DNA w amplikonie sonda komplementarna wiąże się z nią, a następnie ulega rozszczepieniu pod wpływem polimerazy DNA Z05-AS1, wykazującej aktywność nukleazy w kierunku od końca 5' do końca 3' łańcucha. Po oddzieleniu się barwnika reporterowego od wygaszacza wskutek aktywności nukleazy można zmierzyć promieniowanie fluorescencyjne o charakterystycznej długości fali po wzbudzeniu barwnika reporterowego odpowiednim widmem światła. Do znakowania mutacji docelowych dla tego testu użyto czterech różnych barwników reporterowych. Produkty amplifikacji docelowych siedmiu sekwencji wchodzących w skład genu kodującego EGFR są wykrywane niezależnie w toku trzech reakcji przez pomiar fluorescencji o czterech charakterystycznych długościach fal w wydzielonych kanałach optycznych.

Amplifikacja wybiórcza

Amplifikację wybiórczą badanego kwasu nukleinowego z próbki klinicznej przy użyciu testu **cobas** EGFR Test uzyskuje się dzięki zastosowaniu enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) i trójfosforanu dezoksyurydyny (dUTP).¹⁵ Enzym AmpErase rozpoznaje i katalizuje niszczenie nici DNA zawierających dezoksyurydynę, lecz nie łańcuchów DNA zawierających tymidynę. Dezoksyurydyna nie wchodzi w skład występującego w naturze DNA, jest natomiast zawsze obecna w amplikonie wskutek użycia dUTP zamiast trójfosforanu dezoksytymidyny jako jednego z trójfosforanów nukleotydów w odczynnikach Master Mix; dlatego wyłącznie amplikon zawiera dezoksyurydynę. Dezoksyurydyna powoduje wrażliwość zanieczyszczającego amplikonu na rozkład przez enzym AmpErase przed amplifikacją docelowego DNA. Enzym AmpErase zawarty w odczynnikach Master Mix katalizuje rozkład DNA zawierającego dezoksyurydynę w miejscu reszt dezoksyurydynowych przez otwarcie łańcucha dezoksyrybozy w pozycji C1. Podczas ogrzewania w pierwszym cyklu termicznym przy wartościach pH oznaczających środowisko zasadowe łańcuch amplikonu DNA pęka w miejscu, w którym znajduje się dezoksyurydyna, wykluczając w ten sposób dalszą amplifikację DNA. Enzym AmpErase jest nieczynny w temperaturze powyżej 55°C, tj. w czasie trwania całego cyklu termicznego, dlatego też nie niszczy on amplikonu docelowego. Wykazano, że test **cobas** EGFR inaktywuje zmutowany amplikon EGFR zawierający dezoksyurydynę.

W PRZYPADKU PRÓBEK TKANKI NALEŻY POSTĘPOWAĆ ZGODNIE Z INSTRUKCJAMI W CZĘŚCI A.

W PRZYPADKU PRÓBEK OSOCZA NALEŻY POSTĘPOWAĆ ZGODNIE Z INSTRUKCJAMI W CZĘŚCI B.

CZĘŚĆ A: DO STOSOWANIA Z PRÓBKAMI TKANKI

Szczegółowe informacje na temat izolacji DNA od próbek tkanki podano w sekcji **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Materiały i odczynniki

Dostarczone materiały i odczynniki

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 testów (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N 06471366001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydru sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N 06471382001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydru sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 testów (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N 07248610001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydku sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych
	MGAC (Octan magnezu) (M/N 05854326001) Octan magnezu 0,09% azydku sodu	6 × 0,2 ml	Brak danych
	EGFR MC (EGFR Kontrola mutacji) (M/N 06471455001) Bufor Tris EDTA Poli-rA RNA (syntetyczny) 0,05% azydku sodu <0,1% plazmidowego DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencje eksonów: 18, 19, 20 i 21 genu kodującego EGFR <0,1% naturalnie występującego DNA genu kodującego EGFR (z hodowli komórkowej)	6 × 0,1 ml	Brak danych
	DNA SD (rozcieżczalnik próbki DNA) (M/N 05854474001) Bufor Tris-HCl 0,09% azydku sodu	2 × 3,5 ml	Brak danych

Przechowywanie i użytkowanie odczynników

Odczynnik	Temperatura przechowywania	Czas przechowywania
cobas® EGFR Mutation Test v2*	Od 2°C do 8°C	Po otwarciu zachowują stabilność do 4-krotnego użycia w ciągu 90 dni lub do podanej daty ważności, w zależności od tego, który termin wypada wcześniej.

* Odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** oraz roboczy odczynnik MMX (przygotowany przez dodanie odczynnika **MGAC** do **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2**) należy chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło. Roboczy odczynnik MMX trzeba przechowywać w zaciemnionym miejscu w temperaturze od 2°C do 8°C. Przygotowane próbki i kontrole należy dodać do roboczego odczynnika MMX w ciągu 1 godziny od jego przygotowania. Amplifikację należy rozpocząć w ciągu 1 godziny od chwili dodania przygotowanych próbek badanych i kontrolnych do roboczego odczynnika MMX.

Wymagane materiały dodatkowe

Materiały	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Wybielacz	Dowolny dostawca
70% etanol	Dowolny dostawca
Płytki z mikrodołkami systemu cobas® 4800 (płytki AD) i folie do zaklejania	Roche 05232724001
Aplikator folii do zaklejania systemu cobas® 4800 (dostarczany wraz z instalacją systemu cobas® 4800)	Roche 04900383001
Pipetory regulowane* (mogące pipetować 5–1000 µl)	Dowolny dostawca
Wolne od DNaz końcówki z osłoną aerozoleową lub wyrzutnikiem	Dowolny dostawca
Probówki do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem (jałowe o pojemności 1,5 ml, wolne od RNaz/DNaz, o czystości do PCR)	Dowolny dostawca
Statywy do probówek do mikrowirówki	Dowolny dostawca
Spektrofotometr do pomiaru stężenia DNA*	Dowolny dostawca
Mieszadło wibracyjne*	Dowolny dostawca
Rękawiczki jednorazowe, bezpudrowe	Dowolny dostawca
Zamrażarka umożliwiająca przechowywanie w temperaturze od –25°C do –15°C	Dowolny dostawca

* Całe wyposażenie powinno być konserwowane zgodnie z instrukcjami producenta.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane
Analizator cobas z 480
Jednostka sterująca systemu cobas® 4800 z oprogramowaniem systemowym w wersji 2.1 lub nowszej
Pakiet oprogramowania EGFR Tissue P1 Analysis Package Software w wersji 1.0 lub nowszy
Zewnętrzny czytnik kodów kreskowych, podłączany do portu USB
Drukarka

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w miejscowym biurze firmy Roche.
- Niniejszy test jest przeznaczony do badania próbek FFPE/NSCLC. Z próbkami należy obchodzić się tak, jak z materiałem zakaźnym, stosując laboratoryjne procedury bezpieczeństwa, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ oraz w dokumencie M29-A4 CLSI.¹⁷
- Zaleca się używanie jałowych, jednorazowych pipet oraz końcówek pipetorów wolnych od DNaz.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- Po pracy z próbkami i zestawami odczynników należy dokładnie umyć ręce.
- Podczas pracy z jakimikolwiek odczynnikami należy używać osłony oczu oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce tego kontaktu należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.

Uwaga: dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

Zanieczyszczenie

- W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana pomiędzy pracą z próbkami a odczynnikami testu **cobas** EGFR. Podczas pracy z próbkami należy unikać zanieczyszczenia rękawiczek.
- Rękawiczki należy często zmieniać, aby ograniczyć możliwość zanieczyszczenia.
- Rękawiczki należy zmieniać przed opuszczeniem obszarów izolacji DNA lub w przypadku podejrzenia kontaktu z roztworami lub próbką.
- Należy unikać zanieczyszczenia odczynników przez rybonukleazy i mikrobiologicznego.
- Przed przygotowaniem MMX należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. Materiały i urządzenia powinny być przeznaczone do każdego z działań; nie mogą być stosowane w innych działaniach lub przenoszone pomiędzy obszarami. Na przykład pipetory i materiały przeznaczone do izolacji DNA nie mogą być stosowane do przygotowywania odczynników do amplifikacji i detekcji.
- Zdecydowanie zaleca się, aby przebieg pracy w laboratorium był jednokierunkowy i polegał na zakończeniu jednej czynności przed przejściem do kolejnej. Na przykład izolację DNA należy zakończyć przed rozpoczęciem amplifikacji i detekcji. Izolacja DNA powinna być prowadzona w obszarze oddzielnym od amplifikacji i detekcji. Aby uniknąć zanieczyszczenia odczynnika roboczego Master Mix próbkami DNA, obszar roboczy amplifikacji i detekcji powinien być dokładnie oczyszczony przed przygotowaniem odczynnika roboczego Master Mix.

Integralność

- Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- Nie należy mieszać odczynników pochodzących z różnych zestawów lub serii.
- Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

Utylizacja

- Odczynniki **MGAC**, **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2**, **EGFR MC** i **DNA SD** zawierają azydek sodu. Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy spłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- Należy zutylizować wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Rozlanie płynów i czyszczenie

- Jeśli do rozlania płynu dojdzie na powierzchni aparatu **cobas® 4800**, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w odpowiednim podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System** w celu przeprowadzenia czyszczenia.
- Do czyszczenia analizatora **cobas z 480** nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacza). Czyszczenie analizatora **cobas z 480** należy przeprowadzać zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka skażenia, dotyczące analizatora **cobas z 480** można znaleźć w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Pobieranie próbek

Próbki NSCLC FFPET zostały zatwierdzone do wykorzystania w teście **cobas EGFR Test**.

Transport, przechowywanie i stabilność próbek

Próbki FFPET NSCLC można transportować w temperaturze od 15°C do 30°C. Próbki FFPET muszą być transportowane zgodnie z krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi przepisami dotyczącymi transportu czynników chorobotwórczych.¹⁸

Stabilność próbek FFPET została potwierdzona do upływu maksymalnie 12 miesięcy od daty pobrania w przypadku przechowywania w temperaturze od 15°C do 30°C. Skrawki o grubości 5 µm osadzone na szkiełkach można przechowywać w temperaturze od 15°C do 30°C przez maksymalnie 60 dni.

Próbki FFPET zachowują stabilność przez:

Typ próbki FFPET	Bloczek FFPET	Skrawek 5 µm FFPET
Temperatura przechowywania próbek FFPET	Od 15°C do 30°C	Od 15°C do 30°C
Czas przechowywania	Do 12 miesięcy	Do 60 dni

Przechowywanie i stabilność próbki przetworzonej

Próbki przetworzone (wyizolowany DNA) zachowują stabilność przez jeden z następujących okresów:

Temperatura przechowywania wyizolowanego DNA	Od -15°C do -25°C	Od 2°C do 8°C	Od 15°C do 30°C
Czas przechowywania	Do 3 cykli zamrażania i rozmrażania w ciągu 60 dni	Do 14 dni	Do 1 dnia

Wyizolowany DNA powinien być używany w zalecanych okresach przechowywania lub przed upływem daty ważności zestawu **cobas®** DNA Sample Preparation Kit użytego do izolacji DNA, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.

Procedura testowa

Wykonywanie oznaczenia

Ryc. 1 Przebieg pracy z testem cobas EGFR Test i zestawem cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Uruchomienie systemu.
2	Wykonanie czynności konserwacyjnych aparatów.
3	Wyjęcie próbek i odczynników z miejsca przechowywania.
4	Pozbawienie próbek parafiny.
5	Przeprowadzenie izolacji DNA.
6	Elucja DNA.
7	Utworzenie zlecenia pracy i wydrukowanie układu płytki.
8	Przygotowanie odczynników do amplifikacji.
9	Ładowanie odczynników do amplifikacji na płytkę AD
10	Ładowanie próbki na płytkę AD
11	Uszczelnienie płytki AD
12	Ładowanie płytki AD na analizator cobas z 480
13	Rozpoczęcie przebiegu.
14	Przeanalizowanie wyników.
15	W przypadku korzystania z systemu LIS: przesłanie wyników do systemu LIS.
16	Wyjęcie płytki z analizatora.

Instrukcja użytkowania

Uwaga: do badania za pomocą testu **cobas EGFR** można używać wyłącznie skrawków próbki FFPET NSCLC o grubości 5 µm, zawierających co najmniej 10% tkanki guza z danego obszaru. Każdą próbkę zawierającą mniej niż 10% tkanki guza z danego obszaru należy po pozbawieniu jej parafiny przeciąć makroskopowo.

Uwaga: szczegóły dotyczące obsługi analizatora **cobas z 480** zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Wielkość przebiegu

Pojedynczy przebieg testowy może obejmować od 1 do 30 próbek (plus kontrole) w każdej płytce z 96 mikrodołkami. Przy przeprowadzaniu przebiegu testowego obejmującego więcej niż 24 próbki trzeba będzie użyć wielu zestawów testu **cobas EGFR**.

Test **cobas EGFR** zawiera ilość odczynników wystarczającą do wykonania 8 przebiegów testowych po 3 próbki (plus kontrole), czyli maksymalnie na 24 próbki na zestaw.

Kontrola całego procesu

Ten test wymaga kontroli ujemnej całego procesu. Przy każdym przebiegu, należy przeprowadzić przetwarzanie kontroli ujemnej jednocześnie z próbką(-ami) zaczynając od procedury **izolacji DNA**.

Izolacja DNA

DNA izoluje się od próbek FFPET za pomocą zestawu **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Przecięcie makroskopowe

Jeżeli próbka zawiera poniżej 10% tkanki guza z danego obszaru, próbkę należy przeciąć makroskopowo w ramach przygotowywania próbki.

Ocena ilościowa stężenia DNA

Uwaga: pomiar stężenia DNA należy przeprowadzać natychmiast po zakończeniu procedury izolacji DNA i przed odłożeniem materiału do przechowywania.

Uwaga: przechowywać roztwór podstawowy DNA zgodnie z instrukcjami w części **Transport, przechowywanie i stabilność próbek**.

1. Wymieszać każdy roztwór podstawowy DNA na mieszadłe wibracyjnym przez 5 sekund.
2. Przeprowadzić ocenę ilościową stężenia DNA za pomocą spektrofotometru zgodnie z protokołem postępowania, podanym przez producenta urządzenia. Do wyzerowania urządzenia użyć odczynnika **DNA EB** z zestawu **cobas®** DNA Sample preparation kit. Należy obliczyć średnią z dwóch zgodnych odczytów. Wyniki dwóch pomiarów powinny mieścić się w granicach $\pm 10\%$ każdego z nich przy odczytach stężenia DNA $\geq 20,0$ ng/ μ l. W przypadku odczytów stężenia DNA $< 20,0$ ng/ μ l wyniki dwóch pomiarów powinny mieścić się w granicach ± 2 ng/ μ l. Jeżeli wyniki dwóch pomiarów nie mieszczą się w granicach $\pm 10\%$ każdego z nich przy odczytach stężenia DNA $\geq 20,0$ ng/ μ l lub w granicach ± 2 ng/ μ l przy odczytach stężenia DNA $< 20,0$ ng/ μ l, należy uzyskać dodatkowe 2 odczyty, aby wymogi badania zostały spełnione. Wówczas należy obliczyć średnią z dwóch nowych wyników pomiarów.

Uwaga: nie ma potrzeby wykonywania pomiarów w przypadku roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z przetworzonej kontroli ujemnej (**NEG**).

3. Stężenie roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbek, musi być ≥ 2 ng/ μ l, aby można było wykonać test **cobas** EGFR. Każdą próbkę poddaje się trzykrotnej amplifikacji/detekcji z użyciem w każdej amplifikacji/detekcji 25 μ l rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA o stężeniu 2 ng/ μ l (co daje ogółem 50 ng DNA).

Uwaga: aby można było przeprowadzić test **cobas** EGFR Test, każdy roztwór podstawowy DNA musi mieć minimalne stężenie 2 ng/ μ l. Jeżeli stężenie roztworu podstawowego DNA nie przekracza 2 ng/ μ l, należy powtórzyć procedury pozabawiania próbek parafiny, izolacji DNA i oceny ilościowej stężenia DNA z użyciem dwóch skrawków FFPET tej próbki o grubości 5 μ m. W przypadku próbek osadzonych na szkiełkach po pozabawieniu ich parafiny należy połączyć tkankę z obu skrawków w jednej probówce, zanurzyć tkankę w odczynnikach **TLB + PK** z zestawu **cobas** DNA Sample Preparation Kit, a następnie przeprowadzić izolację oraz ocenę ilościową stężenia DNA. W przypadku próbek nieosadzonych na szkiełkach, należy połączyć tkankę z obu skrawków w jednej probówce, odparafinować, a następnie przeprowadzić izolację DNA i ocenę ilościową. Jeżeli stężenie roztworu podstawowego DNA nadal jest < 2 ng/ μ l, należy zwrócić się do ośrodka klinicznego, zlecającego wykonanie badania, o przysłanie kolejnej próbki FFPET.

Amplifikacja i detekcja

Uwaga: aby zapobiec zanieczyszczeniu roboczego odczynnika MMX próbkami DNA, należy przeprowadzać amplifikację i detekcję w miejscu oddzielnym od obszaru wykonywania izolacji DNA. Przed przygotowaniem MMX należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. W celu właściwego oczyszczenia należy dokładnie przetrzeć wszystkie powierzchnie, włącznie ze statywami i pipetorami, 0,5% roztworem podchlorynu sodu, a następnie 70% roztworem etanolu. Dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

Konfiguracja aparatu

Wskazówki dotyczące konfiguracji analizatora **cobas z 480** zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Konfiguracja zlecenia testu

Szczegółowe wskazówki dotyczące etapów przebiegu pracy przy wykonywaniu badań genu kodującego EGFR zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Wygenerować mapę płytki z pozycjami wszystkich próbek i kontroli do przebiegu. W serii oznaczeń zawierającej wyłącznie próbki tkankowe kontrola mutacji jest umieszczana w pozycjach **A01–A03** płytki. Kontrola ujemna jest umieszczona w pozycjach **B01–B03** płytki. Następnie rozcieńczone próbki są dodawane w zestawach po 3 kolumny począwszy od **C01–C03** do **H10–H12**, jak przedstawia to Ryc. 2.

Test **cobas EGFR** można oznaczać w trybie mieszanym testów (np. EGFR Tissue (EGFR — tkanki) w połączeniu z EGFR Plasma (EGFR — osocze)). Pozycje kontroli mogą się zmieniać w zależności od wybranych testów i liczby próbek. Bardziej szczegółowe informacje opisujące sposób skonfigurowania trybu mieszanego testu opisano w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Ryc. 2 Układ płytki dla testu cobas EGFR Test

Rząd/kolumna	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

Gdzie: MC = kontrola mutacji, NEG = kontrola ujemna, S# = identyfikator próbki, a MMX-# odpowiada odczynnikowi Master Mix 1, 2 lub 3 v2.

Uwaga: każda próbka musi rozciągać się przez trzy kolejne kolumny w jednym rzędzie, aby możliwe było utworzenie wyniku.

Uwaga: odczynnik roboczy Master Mix 1 musi być umieszczony w kolumnie 01, 04, 07 i 10 na płytce. Odczynnik roboczy Master Mix 2 musi być umieszczony w kolumnie 02, 05, 08 i 11 na płytce. Odczynnik roboczy Master Mix 3 v2 musi być umieszczony w kolumnie 03, 06, 09 i 12 na płytce.

Uwaga: na jednej płytce można umieścić do 30 próbek. Jeżeli do przetworzenia wszystkich próbek na płytce potrzebny jest więcej niż jeden zestaw odczynnika, wszystkie zestawy muszą pochodzić z tej samej serii.

Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbki

Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA w przypadku stężeń od 2 ng/μl do 36 ng/μl

Uwaga: roztwory podstawowe DNA, pochodzące z próbek, należy rozcieńczać bezpośrednio przed amplifikacją i detekcją.

Uwaga: każdą próbkę poddaje się trzykrotnej amplifikacji/detekcji, co wymaga objętości rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA o stężeniu 2 ng/μl, wynoszącej ogółem 75 μl (po 25 μl na każdą z trzech reakcji) (ogółem 150 ng DNA).

1. Obliczyć dla każdej próbki potrzebną objętość (μl) roztworu podstawowego DNA:

$$\text{Ilość } \mu\text{l roztworu podstawowego DNA} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{stężenie roztworu podstawowego DNA [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Obliczyć dla każdej próbki potrzebną objętość (μl) roztworu **DNA SD**:

$$\text{Ilość } \mu\text{l odczynnika DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \text{ilość } \mu\text{l roztworu podstawowego DNA}$$

Przykład:

$$\text{Stężenie roztworu podstawowego DNA} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \text{ Liczba } \mu\text{l roztworu podstawowego DNA} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$$

$$2. \text{ Ilość } \mu\text{l odczynnika DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$$

Obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA w przypadku stężeń >36 ng/μl

Uwaga: roztwory podstawowe DNA, pochodzące z próbek, należy rozcieńczać bezpośrednio przed amplifikacją i detekcją.

Uwaga: każdą próbkę poddaje się trzykrotnej amplifikacji/detekcji, co wymaga objętości rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA o stężeniu 2 ng/μl, wynoszącej ogółem 75 μl (po 25 μl na każdą z trzech reakcji) (ogółem 150 ng DNA).

1. W przypadku stężeń roztworu podstawowego DNA przekraczających 36 ng/μl do obliczania ilości odczynnika **DNA SD**, wymaganej do przygotowania co najmniej 90 μl rozcieńczonego roztworu podstawowego DNA, należy użyć zamieszczonego poniżej wzoru. Ma to na celu zapewnienie, że do badania każdej próbki zostanie użyta objętość co najmniej 5 μl roztworu podstawowego DNA.
2. Obliczyć dla każdej próbki objętość (μl) odczynnika **DNA SD**, potrzebną do rozcieńczenia 5 μl roztworu podstawowego DNA do stężenia 2 ng/μl:

$$\text{Wymagana obj. DNA SD w } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l roztworu podstawowego DNA} \times \text{stężenie roztworu podstawowego DNA w ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Przykład:

$$\text{Stężenie roztworu podstawowego DNA} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \text{ Wymagana obj. DNA SD w } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$$

$$2. \text{ Użyć obliczonej objętości odczynnika DNA SD do rozcieńczenia 5 } \mu\text{l roztworu podstawowego DNA.}$$

Rozcieńczenie próbek

1. Przygotować stosowną liczbę probówek do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem o pojemności 1,5 ml na rozcieńczenia DNA, oznakowując je odpowiednimi informacjami identyfikującymi próbki.
2. Używając pipetora z końcówką zabezpieczoną przed powstawaniem aerozolu, przenieść pipetą obliczone objętości odczynnika **DNA SD** do odpowiednio oznakowanych probówek. Przenieść pipetą 45 µl odczynnika **DNA SD** do probówki do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem oznakowanej napisem **NEG**.
3. Mieszać każdy roztwór podstawowy DNA i kontrolę ujemną na mieszadle wibracyjnym od 5 do 10 sekund.
4. Używając pipetora z końcówką zabezpieczoną przed powstawaniem aerozolu (nowa końcówka do przenoszenia każdej próbki), delikatnie przenieść pipetą obliczoną objętość każdego roztworu podstawowego DNA do odpowiedniej probówki zawierającej odczynnik **DNA SD**. Przenieść pipetą 45 µl kontroli ujemnej (wyzolowanego eluatu) do probówki z napisem **NEG**.
5. Zamknąć probówki zatyczkami i mieszać zawartość każdej z nich na mieszadle wibracyjnym od 5 do 10 sekund.
6. Zmienić rękawiczki.

Konfiguracja reakcji

Przygotowanie roboczych odczynników Master Mix (MMX-1, MMX-2 i MMX-3 v2)

Uwaga: odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** oraz roboczy odczynnik **MMX** są wrażliwe na światło i należy je chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło.

Uwaga: ze względu na lepkość odczynników **EGFR MMX** oraz roboczego odczynnika **MMX** przenoszenie pipetą należy wykonywać powoli, aby zagwarantować podanie z końcówki całej objętości mieszaniny.

Uwaga: odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** i **EGFR MMX-3 v2** mogą przybierać zabarwienie jasnoniebieskie lub zbliżone do purpury. Nie wpływa to na działanie odczynnika.

Przygotować w oddzielnych probówkach do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem o pojemności 1,5 ml trzy większe porcje odczynników potrzebnych do sporządzenia roboczych odczynników **MMX**: jedną odczynnik **EGFR MMX-1**, jedną odczynnik **EGFR MMX-2** i jedną odczynnik **EGFR MMX-3 v2**.

1. Obliczyć objętość odczynnika **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2** wymaganą do sporządzenia każdego z odczynników roboczych **MMX** według następującego wzoru:

Wymagana objętość odczynnika **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2** = (liczba próbek + 2 kontrole + 1) × 20 µl

2. Obliczyć objętość odczynnika **MGAC**, wymaganą do sporządzenia każdego z odczynników roboczych **MMX**, według następującego wzoru:

Wymagana objętość odczynnika **MGAC** = (liczba próbek + 2 kontrole + 1) × 5 µl

Posługując się Tabelą 4 określić objętość każdego odczynnika, potrzebną do przygotowania roboczego odczynnika **MMX**, na podstawie liczby próbek włączonych do przebiegu testowego.

Tabela 4 Objętości odczynników, potrzebne do sporządzenia roboczego odczynnika **MMX-1**, roboczego odczynnika **MMX-2** i roboczego odczynnika **MMX-3 v2**

		Liczba próbek*									
		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
Całkowita obj. każdego roboczego odczynnika MMX (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Objętości odpowiadające liczbie próbek obliczono na podstawie sumy: liczba próbek + 2 kontrole + 1.

- Wyjąć odpowiednią liczbę fiolek z odczynnikami **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** i **MGAC** z miejsca, w którym były przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C. Przed użyciem każdego odczynnika mieszać go przez 5 sekund na mieszadle wibracyjnym, po czym zgromadzić płyn na dnie probówki. Oznakować jałową probówkę do mikrowirówki, przeznaczoną na roboczy odczynnik MMX-1, roboczy odczynnik MMX-2 i roboczy odczynnik MMX-3 v2.
- Dodać obliczoną objętość odczynnika **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2** do odpowiedniej probówki przeznaczonej na roboczy odczynnik MMX.
- Dodać obliczoną objętość odczynnika **MGAC** do probówek przeznaczonych na robocze odczynniki MMX.
- Mieszać zawartość probówek na mieszadle wibracyjnym od 3 do 5 sekund, aby zapewnić dostateczne wymieszanie odczynnika.

Uwaga: próbki i kontrole należy dodać do płytki AD w ciągu 1 godziny od przygotowania roboczych odczynników MMX.

Uwaga: należy używać wyłącznie płytki AD systemu **cobas® 4800** oraz odpowiedniej folii do zaklejania.

Przygotowanie płytki

- Przenieść pipetą 25 µl roboczego odczynnika MMX do każdego dołka reakcyjnego płytki AD, potrzebnego do przeprowadzenia przebiegu testowego. Nie można dopuścić do tego, aby końcówka pipetora dotknęła płytki poza obrębem dołka.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-1 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-1**) do dołków płytki AD w kolumnach 01, 04, 07 i 10, zgodnie z potrzebą.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-2 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-2**) do dołków płytki AD w kolumnach 02, 05, 08 i 11, zgodnie z potrzebą.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-3 v2 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-3 v2**) do dołków płytki AD w kolumnach 03, 06, 09 i 12, zgodnie z potrzebą.
- Przenieść pipetą 25 µl odczynnika **EGFR MC** do dołków **A01**, **A02** i **A03** płytki AD; dokładnie wymieszać, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem co najmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka.
- Używając nowej końcówki pipetora, przenieść pipetą 25 µl roztworu **NEG** do dołków **B01**, **B02** i **B03** płytki AD; dokładnie wymieszać, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem co najmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka.

Uwaga: każdy przebieg testowy musi zawierać odczynnik **EGFR MC** w dołkach **A01**, **A02** i **A03** oraz **NEG** w dołkach **B01**, **B02** i **B03**; w przeciwnym razie przebieg testowy zostanie odrzucony przez analizator **cobas z 480** jako nieważny.

Uwaga: należy zmieniać rękawice zgodnie z potrzebami, aby chronić próbki przed wzajemnym zanieczyszczeniem zawartym w nich materiałem oraz chronić probówki do reakcji PCR przed zanieczyszczeniem na ich zewnętrznych powierzchniach.

- Używając nowych końcówek pipetora do każdej rozcieńczonej próbki DNA, dodać 25 µl pierwszej próbki DNA do dołków: **C01**, **C02** i **C03** płytki AD; używając nowej końcówki do dodawania próbki DNA do każdego dołka; dokładnie wymieszać zawartość każdego dołka, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem, przynajmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka. Powtórzyć tę procedurę dla DNA z każdej próbki i postępować według szablonu przedstawionego w Ryc. 2, dopóki rozcieńczenia próbek DNA ze wszystkich próbek nie zostaną umieszczone na płytce AD. Upewnić się, że cały płyn zebrał się na dnie dołków.
- Przykryć płytkę AD folią do zaklejania (dostarczoną wraz z płytkami). Użyć aplikatora folii uszczelniającej do szczelnego przytwierdzenia folii do płytki AD.
- Przed rozpoczęciem reakcji PCR potwierdzić, że cały płyn zebrał się na dnie każdego z dołków.

Uwaga: amplifikacja i detekcja powinny rozpocząć się w ciągu 1 godziny od dodania rozcieńczonego roztworu DNA z pierwszej próbki do roboczego odczynnika MMX.

Rozpoczęcie reakcji PCR

Szczegółowe wskazówki dotyczące etapów przebiegu pracy przy wykonywaniu badań genu kodującego EGFR zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**. Po wyświetleniu okna wyskakującego „Select test” wybrać opcję „EGFR Tissue P1” i kliknąć przycisk „OK”.

Wyniki

Interpretacja wyników

Uwaga: walidację przebiegu pracy oraz próbek przeprowadza oprogramowanie **cobas® 4800**.

Uwaga: ważny przebieg testowy może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki badania próbek.

W przypadku ważnego przebiegu wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 5.

Tabela 5 Interpretacja wyniku testu cobas EGFR

Wynik testu	Wynik badania mutacji	Interpretacja
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (może być obecna większa liczba mutacji niż jedna)	Wykryto mutację w określonym regionie docelowym genu kodującego EGFR.
No Mutation Detected (NMD)*	Brak danych	Nie wykryto mutacji w regionach docelowych genu kodującego EGFR.
Nieważny	Brak danych	Wynik badania próbki jest nieważny. Powtórzyć test próbek z nieważnymi wynikami, postępując zgodnie z instrukcją przedstawioną poniżej w rozdziale Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami .
Błąd	Brak danych	Przebieg nie powiódł się wskutek awarii sprzętu lub oprogramowania. Skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

* Wynik „No Mutation Detected” nie wyklucza obecności mutacji w regionach docelowych genu kodującego EGFR, ponieważ wyniki zależą od procentu zmutowanych sekwencji, dostatecznej integralności próbki, braku inhibitorów i wystarczającej do wykrycia ilości DNA.

Flagi wyników są dostępne na karcie Result (Wynik) (ekran) lub w kolumnie Flags (Flagi) (raport). Dalsze informacje opisano w części **Flagi wyników**.

Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami

1. Powtórzyć rozcieńczanie roztworu podstawowego DNA z próbki, która dała wynik nieważny, rozpoczynając od procedur: obliczanie rozcieńczenia roztworu podstawowego DNA, pochodzącego z próbki i Rozcieńczanie próbki w rozdziale **Amplifikacja i detekcja**.
2. Po rozcieńczeniu roztworu podstawowego DNA do stężenia 2 ng/μl w sposób opisany w rozdziale „Rozcieńczenie próbki” kontynuować wykonywanie czynności opisanych w rozdziale „Przygotowanie roboczych odczynników Master Mix (MMX-1, MMX-2 i MMX-3 v2)” oraz pozostałych czynności w ramach procedury amplifikacji i detekcji.

Uwaga: jeżeli po ponownym przeprowadzeniu testu wynik badania próbki nadal jest nieważny lub jeśli nie było dostatecznej ilości roztworu podstawowego DNA do przygotowania kolejnego rozcieńczenia zgodnie z opisem w punkcie 1 rozdziału **Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami**, należy powtórzyć całą procedurę testu dla tej próbki od etapu pozabawienia parafiny i izolacji DNA, używając nowego skrawka FFPE guza o grubości 5 μm.

Kontrola jakości i ważność wyników

Każdy przebieg testowy liczący do 30 próbek zawiera jeden zestaw kontroli mutacji do testu **cobas** EGFR Test (**EGFR MC**) (dołki **A01**, **A02** i **A03**) oraz kontroli ujemnej (**NEG**) (dołki **B01**, **B02** i **B03**) dla odczynników roboczych MMX-1, MMX-2 i MMX-3 v2. Przebieg jest ważny, jeżeli ważne są wyniki dla **EGFR MC** i **NEG**. Jeżeli wynik dla **EGFR MC** lub **NEG** jest nieważny, cały przebieg wymaga powtórzenia. Należy wówczas przygotować świeże rozcieńczenie roztworu podstawowego DNA, wyizolowanego uprzednio z próbki, aby skonfigurować nową płytkę AD wraz z kontrolami w celu przeprowadzenia amplifikacji i detekcji.

Kontrola mutacji

Wynik dla **EGFR MC** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **EGFR MC** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola ujemna

Wynik dla **NEG** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **NEG** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Ograniczenia metody

1. Do badań należy używać wyłącznie określonych rodzajów próbek. Test **cobas** EGFR został zatwierdzony do badania próbek FFPE guza NSCLC.
2. Test **cobas** EGFR Test został zatwierdzony do użytku wyłącznie z zestawem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Detekcja mutacji zależy od liczby kopii obecnych w próbce, na którą wpływać może integralność próbki, ilość wyizolowanego DNA i obecność substancji zakłócających detekcję.
4. Wiarygodność wyników zależy od dostatecznego utrwalenia próbki, jej transportu, przechowywania i przetwarzania. Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w instrukcji użytkowania zestawu **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), niniejszej instrukcji użytkowania oraz w podręczniku operatora systemu **cobas**® 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**® 4800 System.
5. Wpływ innych możliwych zmiennych, takich jak te związane z utrwaleniem próbki, nie został zbadany.

6. Dodanie do odczynnika Master Mix testu **cobas** EGFR Test enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak dla uniknięcia zanieczyszczenia odczynników konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji użytkowania.
7. Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemów **cobas**® 4800 System.
8. Do użycia z tym produktem został zatwierdzony wyłącznie analizator **cobas** z 480. Z tym produktem nie wolno używać żadnego innego termocyklera z systemem optycznym do detekcji w czasie rzeczywistym.
9. Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badanie korelacji stosowanych metod w celu określenia technologicznych różnic występujących pomiędzy nimi.
10. Obecność inhibitorów PCR może prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych lub nieważnych.
11. Mutacje w obrębie regionów genomowego DNA tworzącego gen kodujący EGFR, z którymi wiążą się primery i/lub sondy używane w teście **cobas** EGFR Test, chociaż rzadkie, mogą spowodować niewykrycie obecności mutacji w eksonach 18, 19, 20, 21 (wyniki „No Mutation Detected”).
12. Test **cobas** EGFR Test wykazuje reaktywność krzyżową (wyniki „Mutation Detected”) z mutacją L747S w eksonie 19, rzadką mutacją nabytą, która może odpowiadać za oporność na leczenie TKI.¹⁹
13. Test **cobas** EGFR został zatwierdzony do zastosowania w każdym dołku reakcyjnym DNA w ilości 50 ng. Nie zaleca się stosowania początkowych ilości DNA na poziomie niższym niż 50 ng w każdym dołku reakcyjnym.
14. Test **cobas** EGFR jest testem jakościowym. Test nie jest przeznaczony do ilościowych pomiarów odsetka mutacji.
15. Próbkki NSCLC FFPET zawierające zdegradowany DNA mogą wpływać na zdolność testu do wykrycia mutacji w genie EGFR.
16. Próbkki z wynikami oznaczonymi jako „No Mutation Detected” mogą zawierać mutacje w genie EGFR niewykrywane przez to oznaczenie.
17. Test **cobas** EGFR Test wykrywa mutacje w genie EGFR u pacjentów z NSCLC, u których w komórkach nowotworowych występują substytucje w eksonie 18 (G719X), delecje w eksonie 19, insercje i substytucje w eksonie 20 (T790M, S768I) oraz substytucje w eksonie 21 (L858R, L861Q), ale nie jakiekolwiek inne mutacje w genie EGFR.

Niekliniczna ocena wiarygodności

Uwaga: poniższe opisy badań zawierają dane zbiorcze przeprowadzone z wersjami v1 oraz v2 testu **cobas** EGFR.

W przypadku niżej opisanych badań nieklinicznych, odsetek guza był oceniany przy zastosowaniu badania patologicznego. Do wybrania próbek do badań zastosowano dwukierunkowe sekwencjonowanie metodą Sanger oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Odsetek mutacji w próbce NSCLC FFPET określano metodą NGS.

Czułość analityczna — granica ślepej próby

W celu oceny wiarygodności testu **cobas** EGFR przy braku matrycy i zapewnienia, że ślepa próba nie generuje sygnału analitycznego, który może wskazywać na niskie stężenie mutacji, oceniano próbki bez matrycy i próbki NSCLC FFPET EGFR typu dzikiego. Wykorzystując analizę zaleconą w wytycznych CLSI EP17-A2²⁰, granicę próby ślepej określono jako zero dla wszystkich mutacji.

Granica wykrywalności przy użyciu mieszanek próbek FFPET

Trzy izolaty DNA próbki FFPET dla mutacji delecji eksonu 19, cztery izolaty DNA próbki FFPET dla mutacji L858R, dwa izolaty DNA próbki FFPET podwójnego mutantu dla mutacji L858R i T790M, dwa izolaty DNA próbki FFPET dla mutacji G719A, jeden izolat DNA próbki FFPET podwójnego mutantu dla mutacji T790M i G719A, jeden izolat DNA próbki FFPET podwójnego mutantu dla mutacji G719C i S768I, jeden izolat DNA próbki FFPET podwójnego mutantu dla mutacji S768I i G719S, trzy izolaty DNA próbki FFPET dla mutacji insercji eksonu 20 i trzy izolaty DNA próbki FFPET dla mutacji L861Q wymieszano z izolatami próbki FFPET EGFR typu dzikiego w celu uzyskania mieszanin z próbkami celującymi w poziom mutacji 10, 5,0, 2,5 oraz 1,25%, co określono metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS), która jest zatwierdzona do stosowania w wykrywaniu mutacji EGFR w eksonach 18, 19, 20 i 21. Dla każdej mieszaniny próbek przygotowano seryjne rozcieńczenia i przetworzono osiem powtórzeń każdego elementu panelu z wykorzystaniem każdej z trzech serii zestawów **cobas** EGFR Test (n = 24/element panelu). Granicę wykrywalności każdej próbki określono na podstawie najmniejszej ilości DNA, która dała odsetek wyników „Mutation Detected”, dla mutacji docelowej genu kodującego EGFR, wynoszący co najmniej 95%; wyniki przedstawia Tabela 6.

Tabela 6 Granica wykrywalności testu cobas EGFR Test przy użyciu mieszanek próbek FFPE

Ekson genu kodującego EGFR	Grupa mutacji EGFR	Sekwencja kwasu nukleinowego genu kodującego EGFR	Odsetek mutacji w elemencie panelu konieczny do uzyskania odsetka $\geq 95\%$ wyników „Mutation Detected” przy początkowym poziomie DNA w ilości 50 ng w każdym dołku reakcyjnym (n = 24 powtórzenia)	Identyfikator COSMIC ¹⁴
18	G719X	2156 G>C	2,5	6239
		2156 G>C	4,7	6239
		2155 G>A	3,2	6252
		2155 G>T	5,6	6253
19	Delecja w eksonie 19	2235_2249del15	1,4	6223
		2236_2250del15	2,5	6225
		2239_2256del18*	4,7	6255
		2240_2254del15	7,2	12369
		2240_2257del18	13,4**	12370
		2239_2248>C	2,2	12382
		2237_2255>T*	4,1	12384
		2237_2253>TTGCT*	6,3	12416
		2238_2252del15	2,4	23571
		2238_2252del15*	5,5	23571
20	T790M	2239_2257>GT*	6,0	Nie stwierdzono
		2369 C>T	2,0	6240
		2369 C>T	2,4	6240
	S768I	2369 C>T	3,0	6240
		2303 G>T	1,3	6241
	Insercja w eksonie 20	2303 G>T	2,4	6241
		2307_2308insGCCAGCGTG	1,7	12376
		2319_2320insCAC	6,8	12377
21	L858RP	2310_2311insGGT	1,3	12378
		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

* Dla tych niedominujących delecji w eksonie 19 występujących w kohorcie badania EURLAC przebadano jedynie pojedynczy poziom sekwencji docelowych zawierających około 5% mutacji. Mieszaniny próbek DNA zostały przebadane w 3 ośrodkach biorących udział w badaniu.

** Granica wykrywalności testu **cobas** EGFR dla tej mutacji jest większa niż 10% poziom mutacji z zastosowaniem standardowej początkowej ilości 50 ng w każdym dołku reakcyjnym.

Wyniki tego badania wskazują, że test **cobas** EGFR umożliwia wykrywanie mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu kodującego EGFR przy poziomie mutacji o wartości co najmniej 5% z zastosowaniem standardowej początkowej ilości 50 ng w każdym dołku reakcyjnym.

Minimalna zawartość tkanki guza

Przebadano łącznie 66 niezależnych próbek z mutacjami genu EGFR (tj. 35 próbek mutantów delekcji w eksonie 19 i 31 próbek mutantów L858R w eksonie 21) o zawartości tkanki guza mieszczącej się w przedziale 25–99% w celu określenia minimalnej zawartości tkanki guza wymaganej do wykrycia mutacji w genie EGFR w próbkach NSCLC. W żadnej z przebadanych próbek nie stwierdzono jednoczesnego występowania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R w eksonie 21. Każdą próbkę przebadano bez wykonania przecięcia makroskopowego (w stanie niezmienionym) oraz po przecięciu makroskopowym. Obserwowane wartości CtR dla próbek niezmienionych i poddanych przecięciu makroskopowemu przeanalizowano z użyciem regresji Deminga oraz wykresu Blanda-Altmana (różnice w funkcji wartości średniej). Wyniki potwierdzają zasadność stosowania próbek z zawartością tkanki guza przekraczającą 25% bez przecięcia makroskopowego.

Dodatkowe 10 próbek NSCLC EGFR typu dzikiego (zawartość tkanki guza 1–90%) i 10 próbek mutantów EGFR (zawartość tkanki guza 8–95%) testowano w celu określenia, czy makroskopowe przecięcie próbki tkanki o niskiej zawartości guza NSCLC poprawia wykrywalność testu **cobas** EGFR. Każdą próbkę przebadano bez wykonania przecięcia makroskopowego (w stanie niezmienionym) oraz po przecięciu makroskopowym. Wszystkie wyniki po makroskopowym rozcięciu były zgodne z wynikami bez makroskopowego rozcięcia i oczekiwane wyniki mutacji oraz sekwencji występujących naturalnie obserwowano dla wszystkich 20 próbek.

W badaniu fazy III EURTAC dotyczącym stosowania erlotynibu w porównaniu z chemioterapią opartą na cisplatynie próbki NSCLC FFPET z zawartością tkanki guza poniżej 10% zostały przecięte makroskopowo przed analizą mutacji w genie EGFR. Podgrupa próbek przebadanych przesiewowo w badaniu EURTAC została oceniona pod kątem statusu mutacji w genie EGFR z użyciem testu **cobas** EGFR oraz sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Tabela 7 i Tabela 8 uwzględniają próbki NSCLC z ważnymi sparowanymi wynikami mutacji w eksonie 19 lub L858R genu EGFR połączonymi dla testu **cobas** EGFR Test oraz sekwencjonowania NGS. Podczas korzystania z sekwencjonowania NGS jako metody referencyjnej wyniki wykazały, że w przypadku próbek NSCLC FFPET po przecięciu makroskopowym z zawartością tkanek guza poniżej 10% uzyskano porównywalną dokładność analityczną jak w przypadku próbek NSCLC FFPET nieprzeciętych makroskopowo.

Razem te badania potwierdzają, że przed przeprowadzeniem testu **cobas** EGFR wymagane jest przecięcie makroskopowe w przypadku próbek NSCLC FFPET o zawartości tkanki guza poniżej 10%.

Tabela 7 Skuteczność testu cobas EGFR w przypadku próbek NSCLC FFPET z zawartością tkanki guza ≤ 10% (przeciętych makroskopowo)

Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	97,2% (35/36)	85,8%, 99,5%
Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	94,5% (52/55)	85,1%, 98,1%
Procentowa zgodność ogółem (OPA)	95,6% (87/91)	89,2%, 98,3%

Tabela 8 Skuteczność testu cobas EGFR w przypadku próbek NSCLC FFPET z zawartością tkanki guza > 10% (nieprzeciętych makroskopowo)

Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	93,0% (107/115)	86,9%, 96,4%
Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	98,5% (199/202)	95,7%, 99,5%
Procentowa zgodność ogółem (OPA)	96,5% (306/317)	93,9%, 98,1%

Reaktywność krzyżowa z innymi mutacjami w eksonach 18, 19, 20 i 21

Próbki badania klinicznego EURTAC

Test **cobas** EGFR Test dał wyniki „Mutation Detected” dla następujących mutacji w genie EGFR obserwowanych w przypadku próbek badania klinicznego EURTAC (Tabela 9). Skuteczność analityczna testu **cobas** EGFR Test w wykrywaniu tych mutacji nie została oceniona.

Tabela 9 Mutacje obserwowane w kohorcie EURTAC określone jako reagujące krzyżowo w teście **cobas** EGFR Test

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Nie stwierdzono
	2236_2244del9	E746_R748>E	Nie stwierdzono
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Nie stwierdzono
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Nie stwierdzono

Próbki badania klinicznego AURA2

Test **cobas** EGFR Test dał wynik „Mutation Detected” dla następującej mutacji w genie EGFR obserwowanej w przypadku próbek badania klinicznego AURA2 (Tabela 10). Skuteczność analityczna testu **cobas** EGFR Test w wykrywaniu tej mutacji nie została oceniona.

Tabela 10 Mutacje obserwowane w badaniu AURA2 określone jako reagujące krzyżowo w teście **cobas** EGFR Test

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Swoistość — mikroorganizmy i homologi EGFR

Swoistość testu **cobas** EGFR była oceniana przez badanie mikroorganizmów związanych z płucami oraz plazmidów homologów EGFR tj. plazmidów zawierających sekwencje dla każdego obszaru genetycznego HER2, HER3 i HER4 analogiczne do sekwencji eksonów 18, 19, 20 i 21 EGFR amplifikowanych za pomocą testu **cobas** EGFR.

Mikroorganizmy związane z płucami

Stwierdzono, że jednostki tworzące kolonie *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* w ilości 4×10^5 CFU nie wykazują reaktywności krzyżowej ani nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR po dodaniu podczas etapu lizy tkanki do próbek zawierających naturalnie występujące oraz zmutowane sekwencje genu kodującego EGFR.

Plazmidy homologów EGFR

Wykazano, że powiązane strukturalnie sekwencje analogów białka receptora naskórkowego o aktywności kinazy tyrozynowej (EGFR/HER1, HER2, HER3 i HER4) nie reagują krzyżowo w teście **cobas** EGFR w przypadku dodania przed procedurą amplifikacji/detekcji do roztworu podstawowego wyizolowanego DNA sekwencji potencjalnie reagującej krzyżowo w liczbie kopii genomowych równoważnej 50 ng na reakcję PCR. Uwzględniono warunki kontrolne bez dodatku DNA plazmidowego. Wyniki wykazały, że obserwowane mutacje dla wszystkich 15 przebadanych próbek FFPE były zgodne z oczekiwanymi mutacjami określonymi w drodze sekwencjonowania zarówno w obecności, jak i przy braku dodanego DNA plazmidowego genu HER. Dodatkowo pod kątem reaktywności krzyżowej przebadano mutację L747S w eksonie 19 genu EGFR. Wyniki wykazały, że test **cobas** EGFR reaguje krzyżowo z mutacją L747S w eksonie 19 genu EGFR.

Substancje wpływające na wynik testu

Wykazano, że triglicerydy (37 mM, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹) i hemoglobina (2 mg/ml, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹) nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR Test w przypadku dodania potencjalnej substancji zakłócającej podczas procedury przygotowania próbki na etapie lizy.

Wykazano, że leki albuterol (Ventolin), ipratropium (Atrovent), flutykazon (Flonase), ceftazydym (Fortaz), Imipenem-cylastyna (Primaxin), Piperacillin-tazobaktam, Cilastin (cylastatyna sodu), Betadine oraz lidokaina nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR w przypadku dodania podczas procedury przygotowania próbki na etapie lizy.

Tkanka martwiczka

Wykazano, że próbki FFPET NSCLC z zawartością tkanki martwiczkiej do 60% w przypadku próbek mutantu EGFR oraz do 85% w przypadku próbek typu dzikiego nie zakłócają rozpoznania wyników przy użyciu testu **cobas** EGFR.

Powtarzalność

Powtarzalność testu **cobas** EGFR oceniano przy użyciu sześciu próbek FFPET obejmujących: dwie próbki EGFR typu dzikiego; cztery próbki mutantów EGFR, po jednej delecji w eksonie 19, S768I i G719X, T790M i L858R oraz insercji w eksonie 20. Probki te badało dwukrotnie dwóch operatorów, używając dwóch różnych serii odczynników i dwóch analizatorów **cobas z 480** w ciągu czterech dni. Łącznie oceniano 32 powtórzenia na próbkę. Odsetek prawidłowych rozpoznania testu **cobas** EGFR wyniósł 96,9% (186/192).

Powtarzalność testu **cobas** EGFR oceniano także w drugim badaniu wykorzystującym cztery próbki FFPET obejmujące: jedną próbkę EGFR typu dzikiego; trzy próbki mutantów FFPET EGFR po jednej spośród następujących mutacji: L861Q, G719X i insercja w eksonie 20. Probki badało dwukrotnie dwóch operatorów, używając dwóch różnych serii odczynników i dwóch analizatorów **cobas z 480** w ciągu wielu dni. Test **cobas** EGFR miał dokładność prawidłowych rozpoznania 99,2% (127/128) dla wszystkich połączonych powtórzeń próbek, operatorów, serii odczynników i instrumentów.

Odtwarzalność przygotowywania próbek

Odtwarzalność działania zestawu do przygotowywania próbek **cobas**® DNA Sample Preparation Kit przebadano z użyciem skrawków uzyskanych z trzech bloków z próbkami FFPET — jednego zawierającego delecję w eksonie 19, jednego z mutacją L858R oraz jednego z sekwencją występującą naturalnie. Każdą próbkę badano w dwóch powtórzeniach w każdym ośrodku każdego dnia. Skrawki danej próbki zostały poddane randomizacji i przebadane w ciągu sześciu dni w trzech ośrodkach przez jednego operatora w każdym ośrodku, z użyciem jednego analizatora **cobas z 480** w każdym ośrodku, trzech serii zestawu **cobas**® DNA Sample Preparation Kit oraz jednej serii testu **cobas** EGFR. Każdego dnia każdy operator prowadził izolację i analizę DNA pochodzącego z dwóch skrawków NSCLC FFPET w przypadku każdej próbki z użyciem testu **cobas** EGFR. W ciągu sześciu dni prowadzenia testów dla wszystkich próbek uzyskano ważne i prawidłowe wyniki. Dla połączonych wszystkich próbek i operatorów odsetek prawidłowych rozpoznania testu **cobas** EGFR wyniósł 100% (108/108).

Ocena klinicznej skuteczności testu

Badanie powtarzalności klinicznej 1

Przeprowadzono badanie zewnętrzne w celu oceny powtarzalności testu **cobas** EGFR z udziałem 3 zewnętrznych ośrodków badawczych (2 operatorów na ośrodek) i użyciem 3 serii odczynników przez 5 niekolejnych dni badania z 13-elementowym panelem próbek DNA uzyskanych ze skrawków FFPE próbek NSCLC z naturalnie występującą sekwencją (ang. *wild-type*, WT) oraz obarczonych mutacją (ang. *mutant type*, MT). Ten panel obejmował mutację L858R w eksonie 21 oraz pięć różnych mutacji w eksonie 19 w postaci delecji. Na 92 przebiegi 90 (97,8%) było prawidłowych. Ogółem dla każdego z 13 członów panelu w 90 ważnych cyklach pracy wykonano 2340 testów; wszystkie wyniki testu były ważne. Nie stwierdzono wyników „Mutation Detected” w 180 ważnych testach dla elementów panelu WT, co skutkowało 100% zgodnością. W przypadku 10 spośród 12 elementów panelu MT uzyskano zgodność rzędu 100%. Dla elementu panelu EX19_2240_2257del18 — 5% mutacji, zgodność wyniosła 62,8% (67 ze 180 wyników testu stanowiły wyniki „No Mutation Detected”). Dla elementu panelu EX19_2240_2257del18 — 10% mutacji, zgodność wyniosła 99,4% (1 ze 180 wyników testu był wynikiem „No Mutation Detected”). Wyniki według ogólnej zgodności przedstawia Tabela 11. Współczynnik zmienności (CV) wyniósł < 6% w przypadku wszystkich elementów panelu mutacji. W przypadku każdego elementu panelu wartość CV wyniosła < 3,5%. Dla kontroli zewnętrznej ogólna wartość CV wyniosła < 1,3%. Wartość procentowa CV wyniosła < 0,5% między seriami i < 1,2% w ramach serii.

Tabela 11 Ogólne oszacowania zgodności według elementów panelu w badaniu 1 odtwarzalności testu **cobas** EGFR Test

Człon panelu	Liczba ważnych testów	Zgodność (N)	Odsetek zgodności (95% CI) ^a
Naturalnie występująca	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 — 5% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 — ≤ 10% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 — 5% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 — ≤ 10% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C — 5% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C — ≤ 10% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 — 5% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 — ≤ 10% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 — 5% mutacji	180	113	62,8 (55,3; 69,9)*
EX19_2240_2257del18 — ≤ 10% mutacji	180	179	99,4 (96,9; 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R — 5% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R — ≤ 10% mutacji	180	180	100 (98,0, 100,0)

Uwaga: wyniki uznawano za zgodne, gdy dla elementu panelu mutacji (MT) uzyskano ważny wynik „Mutation Detected” lub gdy dla elementu panelu sekwencji występujących naturalnie uzyskano ważny wynik „No Mutation Detected”.

^a 95% CI = 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

* Czulość analityczna testu **cobas** EGFR w przypadku detekcji tej mutacji jest większa niż 10% z zastosowaniem standardowej początkowej ilości 50 ng w każdym dołku reakcyjnym.

Badanie powtarzalności klinicznej 2

Przeprowadzono badanie zewnętrzne w celu oceny powtarzalności testu **cobas** EGFR Test między 3 ośrodkami badawczymi (2 zewnętrzne i 1 wewnętrzny, 2 operatorów na ośrodek), 3 seriami odczynników przez 5 niekolejnych dni badania z 11-elementowym panelem próbek DNA uzyskanych ze skrawków FFPE próbek NSCLC z naturalnie występującą sekwencją (WT) oraz obarczonych mutacją. Panel ten obejmował mutację G719X w eksonie 18, mutację T790M w eksonie 20, mutację S768I w eksonie 20, insercję w eksonie 20 i mutację L861Q w eksonie 21. Na 91 przebiegi 90 (98,9%) było prawidłowych. Ogółem dla każdego z 11 elementów panelu badanych w dwóch powtórzeniach w 90 ważnych cyklach pracy wykonano 1980 testów; wszystkie wyniki testu były ważne. Nie stwierdzono wyników „Mutation Detected” w 180 ważnych testach dla elementów panelu WT, co skutkowało 100% zgodnością. Zgodności wynosiły 100% dla wszystkich elementów panelu mutacji z wyjątkiem elementu panelu LoD w postaci insercji w eksonie 20. Wyniki według ogólnej zgodności przedstawia Tabela 12 poniżej. Współczynnik zmienności (CV) wyniósł < 9,2% w przypadku wszystkich elementów panelu mutacji. Dla kontroli zewnętrznej ogólna wartość CV wyniosła ≤ 1,3%. Wartość CV wyniosła ≤ 0,6% między seriami i ≤ 1,1% w ramach serii.

Tabela 12 Ogólne oszacowania zgodności według elementów panelu w badaniu 2 odtwarzalności testu **cobas** EGFR Test

Człon panelu	Liczba ważnych testów	Zgodność (N)	% zgodności (95% CI)*
Naturalnie występująca	180	180	100 (98,0, 100,0)
G719X w eksonie 18 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
T790M w eksonie 20 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
S768I w eksonie 20 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Insercja w eksonie 20 — LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
L861Q w eksonie 21 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
G719X w eksonie 18 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
S768I w eksonie 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Insercja w eksonie 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
L861Q w eksonie 21 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Uwaga: wyniki uznawano za zgodne, gdy dla elementu panelu mutacji uzyskano ważny wynik „Mutation Detected” dla mutacji docelowej lub gdy dla elementu panelu sekwencji występujących naturalnie uzyskano ważny wynik NMD.

* 95% CI = 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

CI = przedział ufności (ang. *Confidence Interval*); LoD = granica wykrywalności (ang. *Limit of Detection*);

NMD = brak wykrycia mutacji (ang. *No Mutation Detected*).

Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki fazy III z badania EURTAC

Skuteczność kliniczną testu **cobas** EGFR Test oceniono poprzez porównanie z dwiema metodami referencyjnymi — dwukierunkowym sekwencjonowaniem 2 × metodą Sangera oraz ilościowym sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS) — korzystając z 487 utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek tkanki guza płuc pochodzących od pacjentów z zaawansowanym NSCLC, których poddano badaniu przesiewowemu w ramach badania fazy III EURTAC dotyczącego stosowania TARCEVA® (erlotynib) w porównaniu z chemioterapią opartą na cisplatynie.^{6, 22} Charakterystyka kliniczna i demograficzna pacjentów, których próbki były dostępne do tego badania retrospektywnego, była porównywalna z charakterystyką pacjentów spełniających pod innym względem kryteria kwalifikacji do badania (557), w przypadku których próbki nie były dostępne do przeprowadzenia ponownego badania.

W ramach badania EURTAC badaniu przesiewowemu z użyciem skojarzenia testów opracowanych laboratoryjnie, określanych wspólnie mianem oznaczenia badania klinicznego (ang. *Clinical Trial Assay*, CTA) poddano łącznie 1276 pacjentów. Po wykluczeniu pacjentów niespełniających kryteriów badania oraz bez wyników oznaczenia CTA do tego badania potencjalnie kwalifikowało się 1044 pacjentów. W grupie 1044 pacjentów kwalifikujących się do badania próbki 225 z nich uzyskały dodatni wynik dla mutacji w oznaczeniu CTA, próbki 792 pacjentów dały wynik naturalnie występującej sekwencji (WT) w badaniu CTA, a 27 próbek miało niejednoznaczny wynik w badaniu CTA. W przypadku 487 spośród 1044 pacjentów potencjalnie kwalifikujących się do badania dostępne były próbki do przeprowadzenia ponownego badania z użyciem testu **cobas** EGFR.

Wszystkie 487 próbek przebadano metodą ślepej próby z użyciem testu **cobas** EGFR oraz sekwencjonowania metodą Sangera. Spośród nich w przypadku 406 próbek uzyskano ważne wyniki w teście **cobas** EGFR i sekwencjonowaniu metodą Sangera, 38 próbek dało wynik nieważny w teście **cobas** EGFR i sekwencjonowaniu metodą Sangera, a w przypadku 38 i 5 próbek uzyskano nieważne wyniki odpowiednio tylko w sekwencjonowaniu metodą Sangera oraz tylko w teście **cobas** EGFR. Spośród 487 próbek dostępnych do ponownego badania z użyciem testu **cobas** EGFR, 444 próbki dały ważny wynik w teście **cobas** EGFR i zostały również przebadane z użyciem sekwencjonowania NGS. Spośród nich uzyskano 36 nieważnych wyników w drodze sekwencjonowania NGS; z tego powodu 408 próbek uzyskało ważne wyniki w teście **cobas** EGFR i sekwencjonowaniu NGS. Dokładność analityczna testu **cobas** EGFR Test w porównaniu z każdą metodą referencyjną została oceniona poprzez oszacowanie odsetka zgodności wyników dodatnich (ang. *Positive Percentage Agreement*, PPA), odsetka zgodności wyników ujemnych (ang. *Negative Percentage Agreement*, NPA) oraz procentowej zgodności ogółem (ang. *Overall Percentage Agreement*, OPA), a także odpowiednich 95% przedziałów ufności dla mutacji w postaci delekcji w eksonie 19 i L858R łącznie oraz oddzielnie.

W kohorcie badania EURTAC test **cobas** EGFR Test umożliwił wykrycie mutacji w eksonie 19 i eksonie 21 genu EGFR zgodnie z listą, którą zawiera Tabela 13. Spośród mutacji wykrytych w kohorcie badania EURTAC wykazano czułość analityczną w odniesieniu do mutacji, które zawiera Tabela 6.

Tabela 13 Mutacje wykryte przez test cobas EGFR Test w kohorcie EURTAC

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2239_2248 TTAAGAGAAG >C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2253>TTGCT	E746_T751>VA	12416
	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
	2238_2252del15	L747_T751delLREAT	23571
	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Nie stwierdzono
	2236_2244del9	E746_R748>E	Nie stwierdzono
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Nie stwierdzono
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Nie stwierdzono
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Nie stwierdzono
21	2573 T>G	L858R	6224

W analizie zgodności uwzględniono łącznie 406 próbek z ważnymi wynikami testu **cobas** EGFR i sekwencjonowania metodą Sangera. Wartość PPA pomiędzy testem **cobas** EGFR Test i sekwencjonowaniem metodą Sangera wyniosła 96,6% (95% CI: od 91,5% do 98,7%), a wartość NPA — 88,3% (95% CI: od 84,1% do 91,5%) w przypadku łącznej analizy delecji w eksonie 19. i mutacji L858R, co przedstawiono w Tabeli 14. Wartość OPA wyniosła 90,6% z dolną granicą 95% przedziału ufności przekraczającą 87%. Wartości PPA, NPA oraz OPA w przypadku detekcji mutacji w postaci delecji w eksonie 19 przekroczyły 92%. Wartości PPA, NPA oraz OPA w przypadku detekcji mutacji L858R przekroczyły 95%.

Tabela 14 Porównanie testu cobas EGFR z sekwencjonowaniem metodą Sangera w celu wykrywania mutacji delecji w eksonie 19 oraz L858R EGFR

Mutacja	Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Delecja w eksonie 19	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	97,3% (71/73)	90,5%, 99,2%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	92,5% (308/333)	89,2%, 94,9%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	93,3% (379/406)	90,5%, 95,4%
L858R	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	95,3% (41/43)	84,5%, 98,7%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	97,5% (354/363)	95,4%, 98,7%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	97,3% (395/406)	95,2%, 98,5%
Łącznie	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	96,6% (112/116)	91,5%, 98,7%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	88,3% (256/290)	84,1%, 91,5%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	90,6% (368/406)	87,4%, 93,1%

W analizie zgodności uwzględniono łącznie 408 próbek z ważnymi wynikami testu **cobas** EGFR Test i sekwencjonowania metodą NGS. Po porównaniu pomiędzy łącznymi wynikami testu **cobas** EGFR Test i NGS w przypadku detekcji delekcji w eksonie 19. i mutacji punktowej L858R wartości PPA oraz NPA wyniosły odpowiednio 94,0% (95% CI: od 89,1% do 96,8%) i 97,7% (95% CI: od 95,0% do 98,9%), co przedstawiono w Tabeli 15. Wartość OPA wyniosła 96,3% z dolną granicą 95% przedziału ufności wynoszącą 94,0%. Wartości PPA, NPA i OPA w przypadku wykrywania delekcji w eksonie 19 przekroczyły 95%, a wszystkie dolne granice 95% przedziału ufności były wyższe od 90%. Wartości PPA, NPA i OPA w przypadku detekcji mutacji L858R również przekroczyły 95%, a wszystkie dolne granice 95% przedziału ufności wyniosły $\geq 95\%$ z wyjątkiem PPA (90%), co wynikało z małej liczby wykrytych mutacji L858R.

Tabela 15 Porównanie testu cobas EGFR z sekwencjonowaniem metodą NGS w celu wykrywania delekcji w eksonie 19 oraz mutacji L858R genu EGFR

Mutacja	Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Delekcja w eksonie 19	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	95,9% (94/98)	90,0%, 98,4%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	99,7% (309/310)	98,2%, 99,9%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	98,8% (403/408)	97,2%, 99,5%
L858R	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	90,6% (48/53)	79,7%, 95,9%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	98,6% (350/355)	96,7%, 99,4%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	97,5% (398/408)	95,5%, 98,7%
Łącznie	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	94,0% (142/151)	89,1%, 96,8%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	97,7% (251/257)	95,0%, 98,9%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	96,3% (393/408)	94,0%, 97,8%

Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki z badania fazy II AURA2

Skuteczność kliniczna testu **cobas** EGFR Test została oceniona przez jego porównanie ze zwalidowaną platformą sekwencjonowania nowej generacji (NGS) przy użyciu 383 utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek guza raka płuca pochodzących od pacjentów z zaawansowanym NSCLC, którzy zostali poddani badaniu przesiewowemu przy użyciu testu **cobas** EGFR Test w ramach badania fazy II AURA2 dotyczącego produktu leczniczego TAGRISSO® (ozymertynib).

Badaniu przesiewowemu przy użyciu testu **cobas** EGFR Test w ramach badania AURA2 poddano łącznie 472 pacjentów. Po wykluczeniu pacjentów niespełniających kryteriów włączenia do udziału do tego badania kwalifikowało się 383 pacjentów.

Wszystkie 383 próbki przebadano metodą ślepej próby z użyciem testu **cobas** EGFR Test oraz zwalidowanej metody NGS. Spośród nich uzyskano 368 ważnych wyników zarówno za pomocą testu **cobas** EGFR, jak i sekwencjonowania NGS. Uzyskano łącznie 2 nieważne wyniki w teście **cobas** EGFR Test, jak i metodzie NGS, 2 nieważne wyniki tylko w metodzie NGS i 11 nieważnych wyników tylko podczas testu **cobas** EGFR Test. Dokładność analityczną testu **cobas** EGFR Test w wykrywaniu mutacji T790M w porównaniu z metodą referencyjną, NGS, oceniono przez oszacowanie odsetka zgodności wyników dodatnich (ang. *Positive Percentage Agreement*, PPA), odsetka zgodności wyników ujemnych (ang. *Negative Percentage Agreement*, NPA) oraz procentowej zgodności ogółem (ang. *Overall Percentage Agreement*, OPA), a także odpowiednich 95% przedziałów ufności dla mutacji T790M.

W kohorcie badania AURA2 test **cobas** EGFR Test umożliwił wykrycie mutacji w genie EGFR zgodnie z listą, którą zawiera Tabela 16. Spośród mutacji wykrytych w badaniu AURA2 wykazano czułość analityczną w odniesieniu do mutacji, które zawiera Tabela 6.

Tabela 16 Mutacje wykryte za pomocą testu **cobas** EGFR Test w kohorcie AURA2

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

W analizie zgodności uwzględniono łącznie 368 próbek z ważnymi wynikami testu **cobas** EGFR Test i sekwencjonowania metodą NGS. PPA między testem **cobas** EGFR Test i NGS wynosiła 88,3% (95% CI: od 83,8% do 91,7%), NPA wynosiła 97,3% (95% CI: od 92,4% do 99,1%), a OPA wynosiła 91,0% (95% CI: od 87,7% do 93,5%) w przypadku

wykrywania mutacji T790M, jak przedstawia to Tabela 17. Trzydzieści próbek dało dodatni wynik w NGS, lecz ujemny w teście **cobas** EGFR Test: w 10 na 30 próbek odsetek mutacji T790M określony za pomocą NGS wynosił poniżej LoD (< 2% mutacji) testu **cobas** EGFR Test. W przypadku 20 na 30 próbek umiarkowanie opóźniona wartość IC Ct wskazywała niedostateczną możliwość amplifikacji matrycy DNA.

Tabela 17 Porównanie testu cobas EGFR Test z sekwencjonowaniem metodą NGS w celu wykrywania mutacji T790M w genie EGFR

Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	88,3% (226/256)	83,8%, 91,7%
Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	97,3% (109/112)	92,4%, 99,1%
Procentowa zgodność ogółem (OPA)	91,0% (335/368)	87,7%, 93,5%

Dane dotyczące wyniku klinicznego

EURTAC

Badanie EURTAC²² to wieloośrodkowe, randomizowane badanie fazy III, prowadzone metodą otwartej próby w celu porównania stosowania produktu leczniczego TARCEVA® (erlotynib) ze standardową chemioterapią dwulekową związkami platyny w ramach leczenia pierwszej linii u pacjentów z zaawansowanym NSCLC, u których nie stosowano chemioterapii i którzy są obarczeni mutacjami w postaci delecji w eksonie 19 lub substytucji w eksonie 21 (L858R) genu EGFR ocenionych z użyciem oznaczenia badania klinicznego (CTA). Badanie było sponsorowane przez hiszpański zespół badań nad rakiem płuca (Spanish Lung Cancer Group, SLCG). Do udziału w badaniu zakwalifikowano łącznie 174 pacjentów. Wyniki badania wykazały, że w przypadku pacjentów otrzymujących produkt leczniczy TARCEVA® stwierdzono statystycznie istotną różnicę w długości okresu przeżycia bez progresji choroby (PFS) (mediana wartości PFS 10,4 miesiąca w por. z 5,1 miesiąca) w porównaniu z pacjentami leczonymi chemioterapią ze współczynnikiem ryzyka wynoszącym 0,34 ($p < 0,0001$, 95% CI [0,23; 0,49]). Odsetek odpowiedzi na leczenie w przypadku grupy pacjentów otrzymujących produkt leczniczy TARCEVA® był wyższy niż u pacjentów leczonych z użyciem chemioterapii (odpowiednio 65,1% i 16,1%). Nie zaobserwowano istotnej różnicy w całkowitym czasie przeżycia (ang. *Overall Survival*, OS) w obu grupach, gdyż 76% pacjentów otrzymujących standardową chemioterapię przeniesiono do grupy leczonej z użyciem produktu leczniczego TARCEVA®.

Spośród 174 pacjentów włączonych do udziału w badaniu EURTAC 134 przypadki (77% populacji badanej, w tym 69 pacjentów z grupy otrzymującej TARCEVA® oraz 65 pacjentów z grupy leczonej z użyciem chemioterapii) były dostępne do ponownego badania i zostały przebadane retrospektywnie z użyciem testu **cobas** EGFR. Spośród 134 przypadków przebadanych ponownie z użyciem testu **cobas** EGFR dla 116 pacjentów (59 pacjentów z grupy otrzymującej TARCEVA® oraz 57 pacjentów z grupy leczonej z użyciem chemioterapii) uzyskano wynik „Mutation Detected” w teście **cobas** EGFR. Analiza podgrupy 116 pacjentów wykazała, że osoby leczone z użyciem produktu leczniczego TARCEVA® cechowało istotne wydłużenie czasu PFS (mediana wartości PFS 10,4 miesiąca w porównaniu z 5,4 miesiąca) i mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia w postaci progresji choroby lub zgonu (współczynnik ryzyka = 0,34; 95% CI [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) niż w przypadku pacjentów leczonych z użyciem chemioterapii (Ryc. 3). Częstość odpowiedzi na leczenie w grupie leczonej produktem leczniczym TARCEVA® była większa w porównaniu z grupą otrzymującą chemioterapię (odpowiednio 59,3% i 14,0%). Nie zaobserwowano istotnej różnicy w wartości OS pomiędzy dwiema grupami. Obserwowana korzyść kliniczna w podgrupie pacjentów przebadanych z użyciem testu **cobas** EGFR była porównywalna ze stwierdzoną w całej populacji badania (Tabela 18).

Przeprowadzono dodatkową analizę skuteczności w celu uwzględnienia pacjentów, dla których uzyskano dodatni wynik w teście **cobas** EGFR i ujemny lub nieważny wynik w oznaczeniu CTA. Dane uzyskane w najgorszym scenariuszu (przy założeniu współczynnika ryzyka wynoszącego 1 dla pacjentów z dodatnim wynikiem w teście **cobas** EGFR i ujemnym wynikiem oznaczenia CTA) wykazały współczynnik ryzyka wynoszący 0,42 (95% CI [0,26; 0,57]).

Ryc. 3 Wykres Kaplana-Meiera dla wartości PFS według metody leczenia w przypadku pacjentów z mutacją wykrytą w teście cobas EGFR Test (ocena badacza)

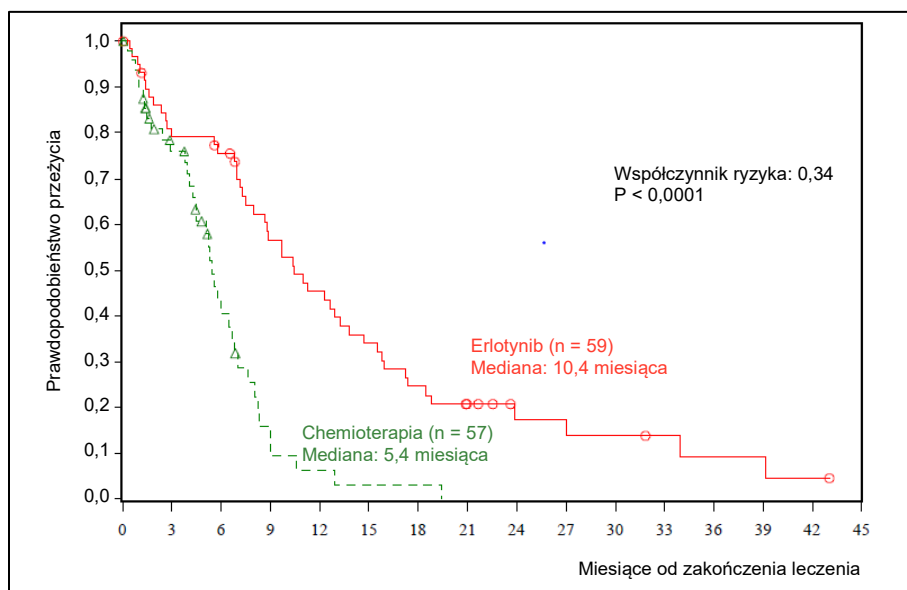


Tabela 18 Korzyści kliniczne w przypadku pacjentów przebadanych z użyciem testu cobas EGFR są porównywalne z obserwowanymi w populacji badania EURTAC

Parametr	Populacja z dodatnim wynikiem testu cobas EGFR n = 116		EURTAC n = 173*	
	Chemioterapia n = 57	Erlotinib n = 59	Chemioterapia n = 87	Erlotinib n = 86
PFS				
Mediana (miesiące)	5,4	10,4	5,1	10,4
Współczynnik ryzyka	0,34		0,34	
95% przedział ufności współczynnika hazardu	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
Wartość P (test log rank)	< 0,0001		< 0,0001	

* Jeden pacjent wycofał zgodę po zakończeniu badania EURTAC, co skutkowało zestawem danych o wielkości n = 173.

AURA2

Badanie AURA2²³ było wieloośrodkowym, jednoramiennym badaniem fazy II prowadzonym metodą otwartej próby, oceniającym bezpieczeństwo i skuteczność produktu leczniczego TAGRISSO® (ozymertynib) jako leczenia drugiej lub ≥ trzeciej linii u pacjentów z zaawansowanym NSCLC, u których doszło do progresji choroby po wcześniejszej terapii dopuszczonym do stosowania TKI EGFR. U wszystkich pacjentów musiał występować NSCLC dodatni pod względem mutacji T790M wykrytej w teście **cobas** EGFR Test. Pierwszorzędową miarą oceny skuteczności był odsetek obiektywnych odpowiedzi (ang. *Objective Response Rate*, ORR) według kryteriów RECIST 1.1 na podstawie zaślepionej niezależnej oceny centralnej (ang. *Blinded Independent Central Review*, BICR) przy użyciu możliwego do oceny zestawu do analizy odpowiedzi. ORR definiowano jako liczbę (%) pacjentów, którzy odbyli co najmniej 1 wizytę i u których stwierdzono odpowiedź całkowitą (ang. *Complete Response*, CR) lub częściową (ang. *Partial Response*, PR) potwierdzoną przynajmniej 4 tygodnie później (tj. najlepsza odpowiedź obiektywna [ang. *Best Objective Response*, BOR] spośród CR lub PR).

07340761001-08PL

Doc. Rev. 7.0

Spośród 472 pacjentów poddanych badaniu przesiewowemu w badaniu AURA2 do przeprowadzenia testu **cobas** EGFR Test kwalifikowało się 383 pacjentów. Spośród tych kwalifikujących się osób 233 pacjentów z obecnością mutacji T790M poddano rekrutacji do badania AURA2, natomiast 210 pacjentów włączono do udziału w badaniu i otrzymywało produkt leczniczy TAGRISSO® (zbiór danych do pełnej analizy [ang. *Full Analysis Set*, FAS]).

Tabela 19 poniżej przedstawia ORR na podstawie BICR i oceny badacza w badaniu AURA2. Spośród 210 pacjentów, którzy otrzymali przynajmniej jedną dawkę produktu leczniczego TAGRISSO® (FAS), u 128 wystąpiła potwierdzona odpowiedź wg BICR z wartością ORR wynoszącą 61,0% (95% CI: od 54,0% do 67,6%), natomiast u 135 odpowiedź wg oceny badacza z wartością ORR na poziomie 64,3% (95% CI: od 57,4% do 70,8%).

W przypadku wszystkich 383 pacjentów kwalifikujących się do udziału w badaniu AURA2 wykonano ponowne badanie z użyciem testu **cobas** EGFR Test. Spośród 233 pacjentów z obecnością mutacji T790M poddanych rekrutacji w ramach badania AURA 2 mutację T790M stwierdzono na podstawie testu **cobas** EGFR Test w przypadku 225 osób, natomiast 204 pacjentów uwzględniono w FAS.

Spośród 204 pacjentów otrzymujących produkt leczniczy TAGRISSO® (FAS) u 127 wystąpiła potwierdzona odpowiedź wg BICR z wartością ORR wynoszącą 62,3% (95% CI: od 55,2% do 68,9%), natomiast u 133 odpowiedź wg oceny badacza z wartością ORR na poziomie 65,2% (95% CI: od 58,2% do 71,7%).

Tabela 19 Korzyści kliniczne w przypadku pacjentów z mutacją T790M przebadanych z użyciem testu cobas EGFR Test w badaniu AURA2

		AURA2			cobas EGFR Test (IVD) Obecność mutacji T790M		
Zbiór danych do analizy	Ocena na podstawie	N	Liczba pacjentów z potwierdzoną odpowiedzią	ORR (95% CI)	N	Liczba pacjentów z potwierdzoną odpowiedzią	ORR (95% CI)
Zbiór danych do pełnej analizy (FAS)	Zaślepiąca niezależna ocena centralna	210	128	61,0% (54,0%, 67,6%)	204	127	62,3% (55,2%, 68,9%)
	Badacz		135	64,3% (57,4%, 70,8%)		133	65,2% (58,2%, 71,7%)

FLAURA

I. Badanie fazy III oceniającej podawanie produktu leczniczego TAGRISSO® w ramach leczenia pierwszego rzutu

Badanie FLAURA¹⁰ było prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby randomizowanym badaniem klinicznym fazy III, którego celem była ocena skuteczności i bezpieczeństwa stosowania produktu leczniczego TAGRISSO® w porównaniu do standardowego leczenia (SoC: TKI EGFR [gefitynib lub erlotynib]) w ramach leczenia pierwszego rzutu u pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym NSCLC, którzy wcześniej nie otrzymywali leczenia ogólnoustrojowego w ramach leczenia zaawansowanej choroby i u których występowały lokalnie lub centralnie potwierdzone mutacje w genie EGFR uwrażliwiające na działanie TKI, delecja Ex19del lub mutacja substytucji L858R, zwane łącznie „dodatnią mutacją EGFRm”. Pierwszorzędnym punktem końcowym badania FLAURA był czas przeżycia bez progresji choroby (ang. *Progression-Free Survival*, PFS) na podstawie oceny badacza u pacjentów należących do zbioru danych do pełnej analizy (ang. *Full Analysis Set*, FAS — wszyscy pacjenci na całym świecie poddani randomizacji).

Do badań przesiewowych pod kątem randomizacji w badaniu dopuszczono 994 pacjentów, gdzie u 809 pacjentów próbki tkanki zmiany nowotworowej poddano badaniom centralnie przy użyciu testu **cobas** EGFR prospektywnie w trakcie badań przesiewowych lub retrospektywnie. Z 556 poddanych randomizacji pacjentów (289 pacjentów zrandomizowanych na podstawie centralnie wykonanego testu **cobas** w próbkach tkanki i 267 pacjentów zrandomizowanych na podstawie testu wykonanego lokalnie), u 500 pacjentów uzyskano potwierdzenie dodatniego wyniku EGFRm w centralnie wykonanym teście **cobas**. Z 267 pacjentów poddanych randomizacji na podstawie testu wykonanego lokalnie,

u 211 pacjentów uzyskano potwierdzenie dodatniego wyniku EGFRm w centralnie wykonanym teście **cobas**, u 41 pacjentów nie wykonano testu **cobas** z powodu braku/niewystarczającej ilości próbki, u 9 pacjentów uzyskano nieważny wynik testu **cobas**, a u 6 pacjentów nie wykryto mutacji w teście **cobas**.

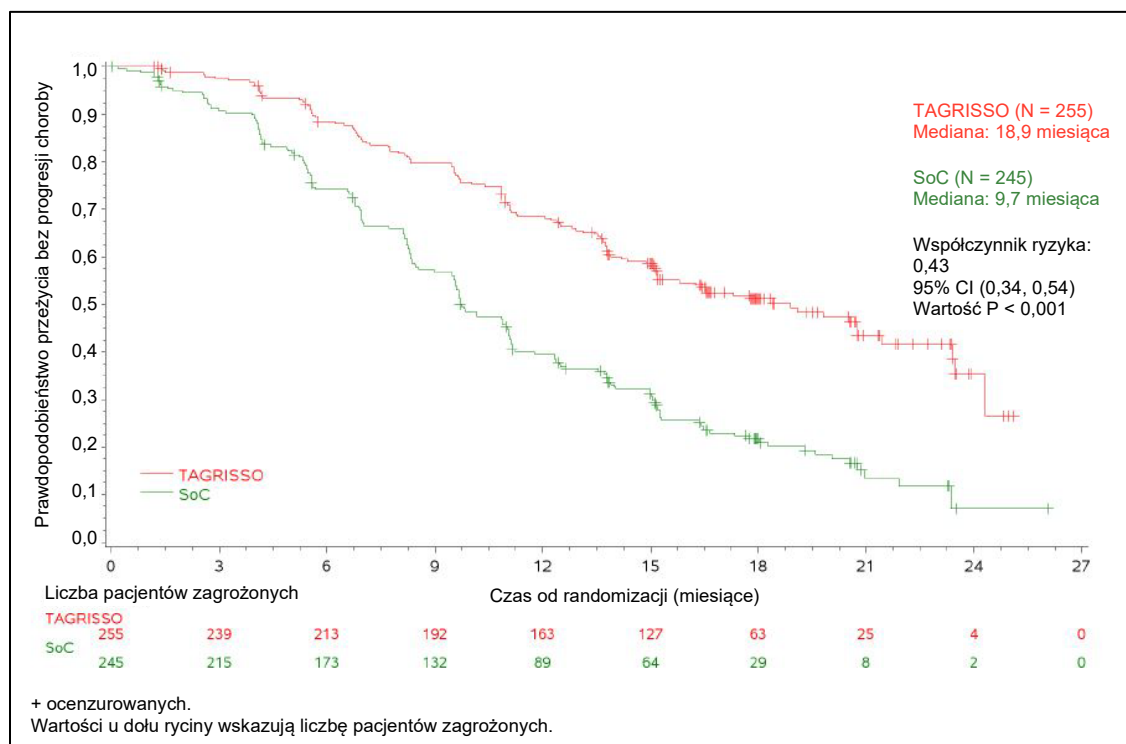
Tabela 20 poniżej prezentuje współczynnik hazardu (HR) dla PFS według oceny badacza dla zbioru danych do pełnej analizy oraz populacji urządzenia głównego (pacjenci z dodatnim wynikiem EGFRm testu **cobas** wykonywanego centralnie). Współczynnik hazardu dla PFS według oceny badacza dla zbioru danych do pełnej analizy (N = 556), na podstawie stratyfikowanego testu logarytmicznego rang wynosił 0,46 (95% CI: 0,37, 0,57). Taką samą estymację punktową uzyskano przy użyciu nieskorygowanego modelu proporcjonalnego hazardu Coxa. Współczynnik hazardu dla PFS według oceny badacza dla populacji urządzenia głównego (N = 500), wyliczony na podstawie nieskorygowanego modelu proporcjonalnego hazardu Coxa, wynosił 0,43 (95% CI: 0,34, 0,54). Skuteczność kliniczna zaobserwowana w populacji urządzenia głównego była spójna ze skutecznością dla zbioru danych do pełnej analizy. Wykres Kaplana-Meiera dla PFS według oceny badacza w populacji urządzenia głównego przedstawia Ryc. 4.

Tabela 20 Czas przeżycia bez progresji choroby w ocenie badacza dla zbioru danych do pełnej analizy badania FLAURA oraz dla zbioru danych do pełnej analizy (populacja z dodatnim wynikiem testu cobas EGFR)

	Zbiór danych do pełnej analizy badania FLAURA N = 556		Populacja z dodatnim wynikiem testu cobas EGFR w badaniu FLAURA (populacja urządzenia głównego) N = 500	
	Ozymertynib (N = 279)	Gefitynib lub erlotynib (N = 277)	Ozymertynib (N = 255)	Gefitynib lub erlotynib (N = 245)
PFS				
Liczba zdarzeń (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Mediana PFS w miesiącach (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)
Współczynnik ryzyka (95% CI) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
Wartość p testu 2-stronnego ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a Nieskorygowany model proporcjonalnego hazardu Coxa.

Ryc. 4 Wykres Kaplana-Meiera dla wartości PFS według metody leczenia w przypadku pacjentów z mutacją wykrytą w teście cobas EGFR Test (ocena badacza) w badaniu FLAURA



II. Analiza standardowego leczenia produktem leczniczym IRESSA®

Przeprowadzono oddzielną analizę tEGFR+ pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA® (gefitynib) w grupie kontrolnej badania FLAURA. Z grupy 178 pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA® 174 uzyskało w ocenie badacza odpowiedź obiektywną [ORR = 67,8% (118/174, 95% CI: 60,6%, 74,3%, POP0 w Tabeli 21)].

Z 79 pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA® i poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego centralnie testu **cobas** w próbkach tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności), u 57 wystąpiła odpowiedź obiektywna z ORR 72,2% (95% CI: 61,4%, 80,8%, POP1 w Tabeli 21).

Efekt terapeutyczny produktu leczniczego IRESSA®, na podstawie testu **cobas** w próbkach tkanki, utrzymywał się w innych populacjach pacjentów z ORR w przedziale od 64,2% (POP2, test wykonywany lokalnie oraz pacjenci tEGFR+ w teście **cobas**) do 68,5% (POP3, wszyscy pacjenci tEGFR+ w teście **cobas**) (Tabela 21 i Rys. 5). Te wyniki są zgodne z wynikami zgłoszonymi dla oryginalnego badania rejestracyjnego (IFUM) dla pacjentów wybranych do stosowania produktu leczniczego IRESSA®.¹³

Tabela 21 Wyniki ORR dla różnych populacji pacjentów na podstawie testu cobas EGFR w próbkach tkanki

Odpowiedź obiektywna	Pacjenci zrandomizowani w grupie SoC leczenia produktem leczniczym IRESSA®				
	Randomizacja centralna (cobas tEGFR+)	Randomizacja lokalna (lokalnie wykonany test tEGFR+)			Ogółem
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Nieważne/nieznane	
Liczba pacjentów	79	70	2	23	174
Odpowiedź	57	45	1	15	118
Brak odpowiedzi	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%)		-	-	-

Uwaga: wykluczono pacjentów z brakiem odpowiedzi obiektywnej.

Uwaga: tEGFR = EGFR w tkankach; CI = przedział ufności.

POP = populacja (podgrupa).

POP1: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu testu **cobas** w próbkach tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności dla testu **cobas** w próbkach tkanki).

POP2: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki.

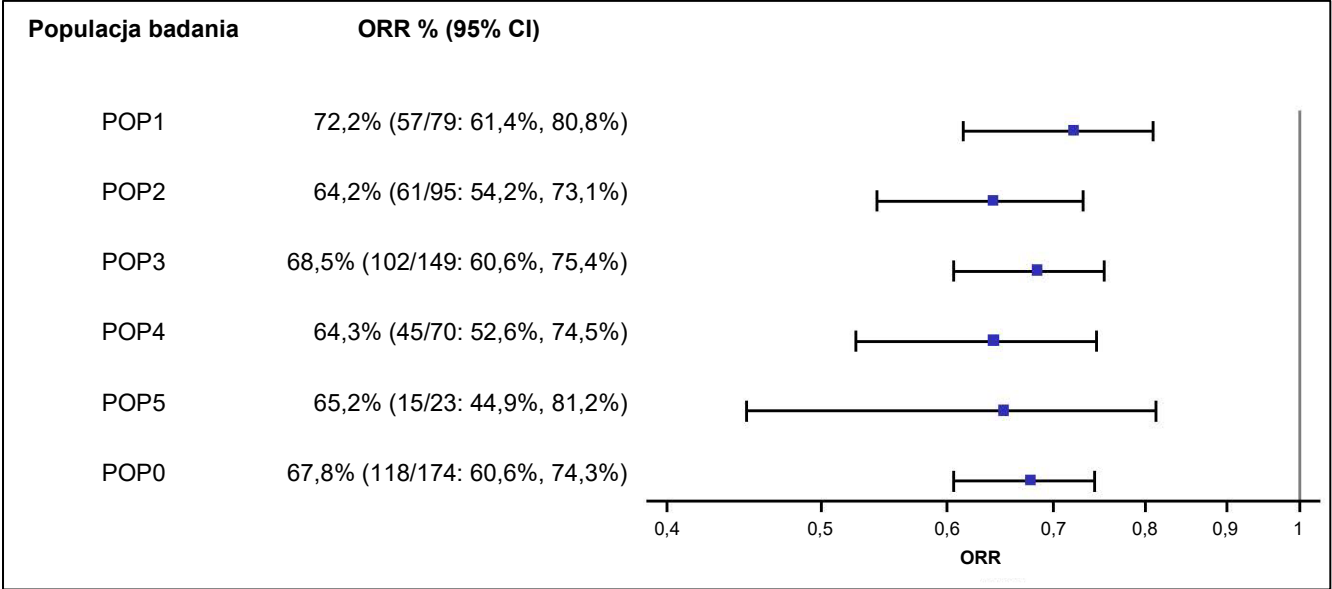
POP3: ORR dla pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbkach tkanki.

POP4: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki oraz z potwierdzeniem w teście **cobas** w próbkach tkanki.

POP5: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki z nieważnym wynikiem testu **cobas** w próbkach tkanki lub bez wykonywania takiego testu.

POP0: ORR dla wszystkich pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA®.

Rys. 5 Wykresy typu Forest Plot współczynników ORR na podstawie testu cobas EGFR w próbkach tkanki dla różnych populacji



POP = populacja (podgrupa).
POP1: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu testu **cobas** w próbkach tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności dla testu **cobas** w próbkach tkanki).
POP2: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki.
POP3: ORR dla pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbkach tkanki.
POP4: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki oraz z potwierdzeniem w teście **cobas** w próbkach tkanki.
POP5: ORR dla pacjentów poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki z nieważnym wynikiem testu **cobas** w próbkach tkanki lub bez wykonywania takiego testu.
POP0: ORR dla wszystkich pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA®.

CZĘŚĆ B: DO STOSOWANIA Z PRÓBKAMI OSOCZA

Przygotowanie próbek

Szczegółowe informacje na temat izolacji DNA od próbek osocza podano w sekcji **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

Materiały i odczynniki

Dostarczone materiały i odczynniki

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 testów (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1) (M/N: 06471366001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydku sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych
	EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2) (M/N: 06471382001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydku sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych

Zestaw/kasety	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 testów (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master Mix 3) (M/N: 07248601001) Bufor Tris Chlorek potasu Glicerol EDTA Tween 20 3,13% dimetylosulfotlenek 0,09% azydku sodu <0,10% dNTP <0,01% polimerazy DNA Z05-AS1 (bakteryjnej) <0,01% enzym AmpErase (uracylo-N-glikozylaza) (bakteryjny) <0,01% aptameru <0,01% primerów sensownych i antysensownych EGFR <0,01% sond EGFR znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym	2 × 0,48 ml	Brak danych
	MGAC (Octan magnezu) (M/N: 05854326001) Octan magnezu 0,09% azydku sodu	6 × 0,2 ml	Brak danych
	EGFR MC (EGFR Kontrola mutacji) (M/N: 06471455001) Bufor Tris EDTA Poli-rA RNA (syntetyczny) 0,05% azydku sodu <0,1% plazmidowego DNA (bakteryjnego) zawierającego sekwencje eksonów: 18, 19, 20 i 21 genu kodującego EGFR <0,1% naturalnie występującego DNA genu kodującego EGFR (z hodowli komórkowej)	6 × 0,1 ml	Brak danych
	DNA SD (rozcieńczalnik próbki DNA) (M/N: 05854474001) Bufor Tris-HCl 0,09% azydku sodu	2 × 3,5 ml	Brak danych

Przechowywanie i użytkowanie odczynników

Odczynnik	Temperatura przechowywania	Czas przechowywania
cobas® EGFR Mutation Test v2*	Od 2°C do 8°C	Po otwarciu zachowują stabilność do 4-krotnego użycia w ciągu 90 dni lub do podanej daty ważności, w zależności od tego, który termin wypada wcześniej.

*Odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** oraz roboczy odczynnik MMX (przygotowany przez dodanie odczynnika **MGAC** do **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2**) należy chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło. Roboczy odczynnik MMX trzeba przechowywać w zaciemnionym miejscu w temperaturze od 2°C do 8°C. Przygotowane próbki i kontrole należy dodać do roboczego odczynnika MMX w ciągu 1 godziny od jego przygotowania. Amplifikację należy rozpocząć w ciągu 1 godziny od chwili dodania przygotowanych próbek badanych i kontrolnych do roboczego odczynnika MMX.

Wymagane materiały dodatkowe

Materiały	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Wybielacz	Dowolny dostawca
70% etanol	Dowolny dostawca
Jałowe, jednorazowe, serologiczne pipety 5 i 25 ml	Dowolny dostawca
Płytki z mikrodołkami systemu cobas® 4800 (płytki AD) i folie do zaklejania	Roche 05232724001
Aplikator folii do zaklejania systemu cobas® 4800 (dostarczany wraz z instalacją systemu cobas® 4800)	Roche 04900383001
Pipetory regulowane* (mogące pipetować 5–1000 µl)	Dowolny dostawca
Wolne od DNaz końcówki z osłoną aerozolu lub wyrzutnikiem	Dowolny dostawca
Mikrowirówka laboratoryjna* (umożliwiająca wirowanie przy 20 000 × g)	Eppendorf 5430 lub 5430R albo odpowiednik
Zamrażarka umożliwiająca przechowywanie w temperaturze od –25°C do –15°C	Dowolny dostawca
Probówki do mikrowirówki z blokowaniem wieczkiem (o pojemności 1,5 ml, wolne od RNaz/DNaz, o czystości do PCR)	Dowolny dostawca
Statywy na wirówki stożkowe i do mikrowirówki	Dowolny dostawca
Mieszadło wibracyjne*	Dowolny dostawca
Rękawiczki jednorazowe bezpudrowe	Dowolny dostawca

* Całe wyposażenie powinno być konserwowane zgodnie z instrukcjami producenta.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane
Analizator cobas z 480
Jednostka sterująca systemu cobas® 4800 z oprogramowaniem systemowym w wersji 2.1 lub nowszej
Pakiet oprogramowania EGFR Plasma P1 Analysis Package Software w wersji 1.0 lub nowszy
Zewnętrzny czytnik kodów kreskowych, podłączany do portu USB
Drukarka

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w miejscowym biurze firmy Roche.
- Niniejszy test jest przeznaczony do badania próbek osocza u osób z NSCLC. Z próbkami należy obchodzić się tak, jak z materiałem zakaźnym, stosując dobre praktyki laboratoryjne, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ oraz w dokumencie M29-A4 CLSI.¹⁷
- Zaleca się używanie jałowych jednorazowych pipet oraz końcówek pipet niezawierających DNazy.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- Po pracy z próbkami i zestawami odczynników należy dokładnie umyć ręce.
- Podczas pracy z jakimikolwiek odczynnikami należy używać osłony oczu oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce tego kontaktu należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.

Uwaga: dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

Zanieczyszczenie

- W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana pomiędzy pracą z próbkami a odczynnikami testu **cobas** EGFR. Podczas pracy z próbkami należy unikać zanieczyszczenia rękawiczek.
- Rękawiczki należy często zmieniać, aby ograniczyć możliwość zanieczyszczenia.
- Rękawiczki należy zmieniać przed opuszczeniem obszarów izolacji DNA lub w przypadku podejrzenia kontaktu z roztworami lub próbką.
- Należy unikać zanieczyszczenia odczynników przez rybonukleazy i mikrobiologicznego.
- Przed przygotowaniem MMX należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. Materiały i urządzenia powinny być przeznaczone do każdego z działań; nie mogą być stosowane w innych działaniach lub przenoszone pomiędzy obszarami. Na przykład pipetory i materiały przeznaczone do izolacji DNA nie mogą być stosowane do przygotowywania odczynników do amplifikacji i detekcji.

- Zdecydowanie zaleca się, aby przebieg pracy w laboratorium był jednokierunkowy i polegał na zakończeniu jednej czynności przed przejściem do kolejnej. Na przykład izolację DNA należy zakończyć przed rozpoczęciem amplifikacji i detekcji. Izolacja DNA powinna być prowadzona w obszarze oddzielnym od amplifikacji i detekcji. Aby uniknąć zanieczyszczenia odczynnika roboczego Master Mix próbkami DNA, obszar roboczy amplifikacji i detekcji powinien być dokładnie oczyszczony przed przygotowaniem odczynnika roboczego Master Mix.

Integralność

- Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- Nie należy mieszać odczynników pochodzących z różnych zestawów lub serii.
- Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

Utylizacja

- Odczynniki **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC i DNA SD** zawierają azydek sodu. Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy spłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- Należy zutylizować wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Rozlanie płynów i czyszczenie

- Jeśli do rozlania płynu dojdzie na powierzchni aparatu **cobas® 4800**, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w odpowiednim podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System** w celu przeprowadzenia czyszczenia.
- Do czyszczenia analizatora **cobas z 480** nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacza). Czyszczenie analizatora **cobas z 480** należy przeprowadzać zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka skażenia, dotyczące analizatora **cobas z 480** można znaleźć w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Pobieranie próbek i praca z próbkami

Probówka firmy Roche do pobierania DNA pozakomórkowego Roche Cell-Free DNA Collection Tube

Osocze z krwi pełnej zebrane w probówce firmy Roche do pobierania DNA pozakomórkowego Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (próbówek Roche cfDNA) zostało zwalidowane do stosowania z testem **cobas** EGFR.

Osocze powinno zostać oddzielone od krwi pobranej do próbki Roche cfDNA w ciągu 7 dni od momentu pobrania. Próbkę krwi pobraną do próbek Roche cfDNA utrzymują stabilność przez okres 7 dni przy przechowywaniu lub transportowaniu w temperaturze 15–25°C, z chwilowymi wychyleniami trwającymi do 16 godzin w temperaturze 15–30°C. Po oddzieleniu osocza próbkę należy przechowywać w sposób opisany w poniższej części zatytułowanej **Transport, przechowywanie i stabilność próbek**.

Uwaga: w próbkach osocza oddzielonych od krwi pobranej do próbek Roche cfDNA zaobserwowano występowanie hemolizy. Jednakże wykazano, że hemoglobina w stężeniu $\leq 2,0$ g/l nie zakłóca działania testu **cobas** EGFR.

Probówka do pobierania z K2 EDTA

Potwierdzono możliwość używania osocza z krwi pełnej pobranej do próbek K2 EDTA razem z testem **cobas** EGFR.

Próbki krwi pełnej pobrane do próbek z K2 EDTA można przechowywać przez okres do 8 godzin w temperaturze $\leq 30^\circ\text{C}$. Po oddzieleniu osocza próbkę należy przechowywać w sposób opisany w poniższej części zatytułowanej **Transport, przechowywanie i stabilność próbek**.

Transport, przechowywanie i stabilność próbek

Próbki osocza muszą być transportowane zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi, dotyczącymi transportu czynników etiologicznych.¹⁸

Próbki osocza zachowują stabilność przez jeden z następujących okresów:

Temperatura przechowywania próbek osocza	$\leq -70^\circ\text{C}$	Od -15°C do -25°C	Od 2°C do 8°C	Od 15°C do 30°C
Czas przechowywania osocza w probówce Roche cfDNA	Do 30 dni	Do 30 dni	Do 7 dni	Do 1 dnia
Czas przechowywania osocza w probówce K2 EDTA	Do 12 miesięcy	Do 12 miesięcy	Do 3 dni	Do 1 dnia

Przechowywanie i stabilność próbki przetworzonej

Próbka przetworzona (wyizolowany cfDNA) z osocza pochodzącego z próbki Roche cfDNA lub K2 EDTA zachowuje stabilność przez jeden z następujących okresów:

Temperatura przechowywania wyizolowanego cfDNA	Od -15°C do -25°C	Od 2°C do 8°C	Od 15°C do 30°C
Czas przechowywania	Do 2 cykli zamrażania i rozmrażania w ciągu 60 dni	Do 21 dni	Do 7 dni

Wyizolowany cfDNA powinien być używany w zalecanych okresach przechowywania lub przed upływem daty ważności zestawu **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit użytego do izolacji DNA, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej.

Przed użyciem izolowanych, przechowywanych roztworów podstawowych DNA, szybko wytrząsać i odwirować próbkę do elucji zawierającą roztwór podstawowy.

Procedura testowa

Wykonywanie oznaczenia

Ryc. 6 Przebieg pracy z testem cobas EGFR Test i zestawem cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

1	Uruchomienie systemu.
2	Wykonanie czynności konserwacyjnych aparatów.
3	Wyjęcie próbek i odczynników z miejsca przechowywania.
4	Przygotowanie próbek do wiązania na kolumnie.
5	Przeprowadzenie izolacji DNA.
6	Elucja DNA.
7	Utworzenie zlecenia pracy i wydrukowanie układu płytki.
8	Przygotowanie odczynników do amplifikacji.
9	Ładowanie odczynników do amplifikacji na płytkę AD
10	Ładowanie próbki na płytkę AD
11	Uszczelnienie płytki AD
12	Ładowanie płytki AD na analizator cobas z 480
13	Rozpoczęcie przebiegu.
14	Przeanalizowanie wyników.
15	W przypadku korzystania z systemu LIS: przesłanie wyników do systemu LIS.
16	Wyjęcie płytki z analizatora.

Instrukcja użytkownika

Uwaga: do stosowania z testem **cobas EGFR** potwierdzono możliwość używania wyłącznie osocza oddzielonego od krwi pobranej do próbek Roche cfDNA lub K2 EDTA.

Uwaga: szczegółowe wskazówki dotyczące obsługi analizatora **cobas z 480** zamieszczono w Instrukcji obsługi analizatora **cobas z 480**.

Wielkość przebiegu

Pojedynczy przebieg testowy może obejmować od 1 do 30 próbek (plus kontrole) w każdej płytce AD z 96 dołkami. Przy przeprowadzaniu przebiegu testowego obejmującego więcej niż 24 próbki trzeba będzie użyć wielu zestawów testu **cobas EGFR**.

Zestaw **cobas EGFR Test** zawiera ilość odczynników wystarczającą do wykonania 8 przebiegów testowych po 3 próbki (plus kontrole), czyli maksymalnie na 24 próbki na zestaw.

Kontrola całego procesu

Ten test wymaga kontroli ujemnej całego procesu. Przy każdym przebiegu, należy przeprowadzić przetwarzanie kontroli ujemnej jednocześnie z próbką(-ami) zaczynając od procedury izolacji DNA.

Izolacja DNA

DNA izoluje się od próbek osocza za pomocą zestawu **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit** (M/N 07247737190).

Amplifikacja i detekcja

Uwaga: aby zapobiec zanieczyszczeniu roboczego odczynnika MMX próbkami DNA, należy przeprowadzać amplifikację i detekcję w miejscu oddzielnym od obszaru wykonywania izolacji DNA. Przed przygotowaniem MMX należy dokładnie oczyścić obszar roboczy amplifikacji i detekcji. W celu właściwego oczyszczenia należy dokładnie przetrzeć wszystkie powierzchnie, włącznie ze statywami i pipetorami, 0,5% roztworem podchlorynu sodu, a następnie 70% roztworem etanolu. Dostępny w handlu płynny wybielacz przeznaczony do zastosowań domowych zazwyczaj zawiera podchloryn sodu o stężeniu 5,25%. Rozcieńczenie domowego wybielacza w stosunku 1:10 daje 0,5% roztwór podchlorynu sodu.

Konfigurowanie aparatu

Wskazówki dotyczące konfigurowania analizatora **cobas** z 480 zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas**® 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**® 4800 System.

Konfiguracja zlecenia testu

Szczegółowe wskazówki dotyczące etapów przebiegu pracy przy wykonywaniu badań genu kodującego EGFR zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas**® 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**® 4800 System.

Wygenerować mapę płytki z pozycjami wszystkich próbek i kontroli do przebiegu. W serii oznaczeń zawierającej wyłącznie próbki osocza kontrola mutacji jest umieszczana w pozycjach **A01–A03** płytki. Kontrola ujemna jest umieszczona w pozycjach **B01–B03** płytki. Następnie próbki są dodawane w zestawach po 3 kolumny począwszy od **C01–C03** do **H10–H12**, jak przedstawia to Ryc. 7.

Test **cobas** EGFR można oznaczać w trybie mieszanym testów (np. EGFR Tissue (EGFR — tkanki) w połączeniu z EGFR Plasma (EGFR — osocze)). Pozycje kontroli mogą się zmieniać w zależności od wybranych testów i liczby próbek. Bardziej szczegółowe informacje opisujące sposób skonfigurowania trybu mieszanego testu opisano w podręczniku operatora testu **cobas**® EGFR Mutation Test v2, w podręczniku operatora systemu **cobas**® 4800 System lub podręczniku użytkownika **cobas**® 4800 System.

Ryc. 7 Układ płytki dla testu cobas EGFR Test

Rząd/kolumna	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

Gdzie: MC = kontrola mutacji, NEG = kontrola ujemna, S# = identyfikator próbki, a MMX-# odpowiada odczynnikowi Master Mix 1, 2 lub 3 v2.

Uwaga: każda próbka musi rozciągać się przez trzy kolejne kolumny w jednym rzędzie, aby możliwe było utworzenie wyniku.

Uwaga: odczynnik roboczy Master Mix 1 musi być umieszczony w kolumnie 01, 04, 07 i 10 na płytce. Odczynnik roboczy Master Mix 2 musi być umieszczony w kolumnie 02, 05, 08 i 11 na płytce. Odczynnik roboczy Master Mix 3 v2 musi być umieszczony w kolumnie 03, 06, 09 i 12 na płytce.

Uwaga: na jednej płytce można umieścić do 30 próbek. Jeżeli do przetworzenia wszystkich próbek na płytce potrzebny jest więcej niż jeden zestaw odczynnika, wszystkie zestawy muszą pochodzić z tej samej serii.

Konfiguracja reakcji

Przygotowanie roboczego odczynnika Master Mix (MMX-1, MMX-2 i MMX-3 v2)

Uwaga: odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** oraz roboczy odczynnik MMX są wrażliwe na światło i należy je chronić przed długotrwałą ekspozycją na światło.

Uwaga: ze względu na lepkość odczynników **EGFR MMX** oraz roboczego odczynnika MMX przenoszenie pipetą należy wykonywać powoli, aby zagwarantować podanie z końcówki całej objętości mieszaniny.

Uwaga: odczynniki **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** i **EGFR MMX-3 v2** mogą przybierać zabarwienie jasnoniebieskie lub zbliżone do purpury. Nie wpływa to na działanie odczynnika.

Uwaga: przygotować w oddzielnych probówkach do mikrowirówki o pojemności 1,5 ml trzy większe porcje odczynników potrzebnych do sporządzenia roboczych odczynników MMX: jedną odczynnik **EGFR MMX-1**, jedną odczynnik **EGFR MMX-2** i jedną odczynnik **EGFR MMX-3 v2**.

1. Obliczyć objętość odczynnika **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2** wymaganą do sporządzenia każdego z odczynników roboczych MMX według następującego wzoru:

$$\text{Wymagana objętość odczynnika EGFR MMX-1 lub EGFR MMX-2 lub EGFR MMX-3 v2} = (\text{liczba próbek} + 2 \text{ kontrole} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Obliczyć objętość odczynnika **MGAC**, wymaganą do sporządzenia każdego z odczynników roboczych MMX, według następującego wzoru:

$$\text{Wymagana objętość odczynnika MGAC} = (\text{liczba próbek} + 2 \text{ kontrole} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Posługując się Tabelą 22 określić objętość każdego odczynnika, potrzebną do przygotowania roboczego odczynnika MMX, na podstawie liczby próbek włączonych do przebiegu testowego.

Tabela 22 Objętości odczynników, potrzebne do sporządzenia roboczego odczynnika MMX-1, roboczego odczynnika MMX-2 i roboczego odczynnika MMX-3 v2

		Liczba próbek*									
		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
Całkowita obj. każdego roboczego odczynnika MMX (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Objętości odpowiadające liczbie próbek obliczono na podstawie sumy: liczba próbek + 2 kontrole + 1.

3. Wyjąć odpowiednią liczbę fiolek z odczynnikami **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** i **MGAC** z miejsca, w którym były przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C. Przed użyciem każdego odczynnika mieszać go przez 5 sekund na mieszadło wibracyjnym, po czym zgromadzić płyn na dnie probówki. Oznakować jałową probówkę do mikrowirówki, przeznaczoną na roboczy odczynnik MMX-1, roboczy odczynnik MMX-2 i roboczy odczynnik MMX-3 v2.

4. Dodać obliczoną objętość odczynnika **EGFR MMX-1** lub **EGFR MMX-2** lub **EGFR MMX-3 v2** do odpowiedniej probówki przeznaczonej na roboczy odczynnik MMX.
5. Dodać obliczoną objętość odczynnika **MGAC** do probówek przeznaczonych na robocze odczynniki MMX.
6. Mieszać zawartość probówek na mieszadło wibracyjnym od 3 do 5 sekund, aby zapewnić dostateczne wymieszanie odczynnika.

***Uwaga:** próbki i kontrole należy dodać do płytki AD w ciągu 1 godziny od przygotowania roboczych odczynników MMX.*

***Uwaga:** należy używać wyłącznie płytki AD systemu **cobas® 4800** oraz odpowiedniej folii do zaklejania.*

Przygotowanie płytki

***Uwaga:** w przypadku stosowania przechowywanych roztworów podstawowych DNA postępować zgodnie z instrukcjami w części **Transport, przechowywanie i stabilność próbek**.*

1. Przenieść pipetą 25 µl roboczego odczynnika MMX do każdego dołka reakcyjnego płytki AD, potrzebnego do przeprowadzenia przebiegu testowego. Nie można dopuścić do tego, aby końcówka pipetora dotknęła płytki poza obrębem dołka.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-1 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-1**) do dołków płytki AD w kolumnach 01, 04, 07 i 10, zgodnie z potrzebą.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-2 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-2**) do dołków płytki AD w kolumnach 02, 05, 08 i 11, zgodnie z potrzebą.
 - Dodać roboczego odczynnika MMX-3 v2 (zawierającego odczynnik **EGFR MMX-3 v2**) do dołków płytki AD w kolumnach 03, 06, 09 i 12, zgodnie z potrzebą.
2. Przenieść pipetą 25 µl odczynnika **EGFR MC** do dołków **A01**, **A02** i **A03** płytki AD; dokładnie wymieszać, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem co najmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka.
3. Używając nowej końcówki pipetora, przenieść pipetą 25 µl roztworu **NEG** do dołków **B01**, **B02** i **B03** płytki AD; dokładnie wymieszać, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem co najmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka.

***Uwaga:** każdy przebieg testowy musi zawierać odczynnik **EGFR MC** w dołkach **A01**, **A02** i **A03** oraz **NEG** w dołkach **B01**, **B02** i **B03**; w przeciwnym razie przebieg testowy zostanie odrzucony przez analizator **cobas z 480** jako nieważny.*

***Uwaga:** należy zmieniać rękawice zgodnie z potrzebami, aby chronić próbki przed wzajemnym zanieczyszczeniem zawartym w nich materiałem oraz chronić probówki do reakcji PCR przed zanieczyszczeniem na ich zewnętrznych powierzchniach.*

4. Używając nowych końcówek pipetora do każdej próbki DNA, dodać 25 µl pierwszej próbki DNA do dołków: **C01**, **C02** i **C03** płytki AD; używając nowej końcówki do dodawania próbki DNA do każdego dołka; dokładnie wymieszać zawartość każdego dołka, aspirując pipetą zawartość i podając ją z powrotem, przynajmniej dwukrotnie w obrębie danego dołka. Powtórzyć tę procedurę dla DNA z każdej próbki i postępować według szablonu, który przedstawia Ryc. 7, dopóki roztwory DNA ze wszystkich próbek nie zostaną umieszczone na płytce AD. Upewnić się, że cały płyn zebrał się na dnie dołków.

***Uwaga:** przed użyciem przechowywanych roztworów podstawowych DNA, szybko wytrząsać i odwirować probówkę do elucji zawierającą roztwór podstawowy.*

5. Przykryć płytkę AD folią do zaklejania (dostarczoną wraz z płytkami). Użyć aplikatora folii uszczelniającej do szczelnego przytwierdzenia folii do płytki AD.
6. Przed rozpoczęciem reakcji PCR potwierdzić, że cały płyn zebrał się na dnie każdego z dołków.

***Uwaga:** amplifikacja i detekcja powinny rozpocząć się w ciągu 1 godziny od dodania rozcieńczonego roztworu DNA z pierwszej próbki do roboczego odczynnika MMX.*

Rozpoczęcie reakcji PCR

Szczegółowe wskazówki dotyczące etapów przebiegu pracy przy wykonywaniu badań genu kodującego EGFR zamieszczono w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**. Po wyświetleniu okna wyskakującego „Select test” wybrać opcję „EGFR Plasma P1” i kliknąć przycisk „OK”.

Wyniki

Interpretacja wyników

Uwaga: walidację przebiegu pracy oraz próbek przeprowadza oprogramowanie **cobas® 4800**.

Uwaga: ważny przebieg testowy może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki badania próbek.

W przypadku ważnego przebiegu wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 23.

Tabela 23 Interpretacja wyniku testu cobas EGFR

Wynik testu	Wynik badania mutacji	Wynik wskaźnika półilościowego (SQI)	Interpretacja
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (może być obecna większa liczba mutacji niż jedna)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (może być obecna większa liczba mutacji niż jedna)	Wykryto mutację w określonym regionie docelowym genu kodującego EGFR.
No Mutation Detected (NMD)*	Brak danych	Brak danych	Nie wykryto mutacji w regionach docelowych genu kodującego EGFR.
Nieważny	Brak danych	Brak danych	Wynik badania próbki jest nieważny. Powtórzyć test próbek z nieważnymi wynikami, postępując zgodnie z instrukcją przedstawioną poniżej w rozdziale Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami .
Błąd	Brak danych	Brak danych	Przebieg nie powiódł się wskutek awarii sprzętu lub oprogramowania. Skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

* Wynik „No Mutation Detected” nie wyklucza obecności mutacji w regionach docelowych genu kodującego EGFR, ponieważ wyniki zależą od stężenia sekwencji zawierających mutacje, dostatecznej integralności próbki, braku inhibitorów i wystarczającej do wykrycia ilości DNA.

Flagi wyników są dostępne na karcie „Result” (Wynik) (ekran) lub w kolumnie „Flags” (Flagi) (raport). Dalsze informacje opisano w części **Flagi wyników**.

Wskaźnik półilościowy (SQI)

SQI to półilościowa miara ilości zmutowanego cfDNA w próbce, której można użyć do pomiaru różnic w obciążeniu mutacją w czasie. Wzrost wartości SQI wskazuje na wzrost ilości odpowiadającej mutacji docelowej w danej próbce, natomiast zmniejszenie wartości SQI wskazuje na spadek całkowitej ilości odpowiadającej mutacji docelowej w danej próbce. Reprezentatywne wyniki wskaźnika SQI dla każdej klasy mutacji genu EGFR wykrywanych w teście przedstawiono w wynikach liniowości: Ryc. 8 – Ryc. 14.

Ponowny test próbek z nieważnymi wynikami

1. Jeżeli przebieg jest nieważny, ilość wyizolowanego DNA dla każdej próbki będzie niewystarczająca, aby powtórzyć amplifikację i detekcję. Powtórzyć całą procedurę testu dla wszystkich próbek zaczynając od izolacji DNA.
2. Jeżeli przebieg jest ważny, ale próbka jest nieważna, ilość wyizolowanego DNA dla każdej próbki będzie niewystarczająca, aby powtórzyć amplifikację i detekcję. Powtórzyć całą procedurę testu dla próbki nieważnej zaczynając od izolacji DNA.

Kontrola jakości i ważność wyników

Każdy przebieg testowy liczący do 30 próbek zawiera jeden zestaw kontroli mutacji do testu **cobas EGFR Test (EGFR MC)** (dołki **A01**, **A02** i **A03**) oraz kontroli ujemnej (**NEG**) (dołki **B01**, **B02** i **B03**) dla odczynników roboczych MMX-1, MMX-2 i MMX-3 v2. Przebieg jest ważny, jeżeli ważne są wyniki dla **EGFR MC** i **NEG**. Jeżeli wynik dla **EGFR MC** lub **NEG** jest nieważny, cały przebieg wymaga powtórzenia.

Kontrola mutacji

Wynik dla **EGFR MC** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **EGFR MC** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Kontrola ujemna

Wynik dla **NEG** musi być oznaczony jako „Valid”. Jeżeli wyniki oznaczenia **NEG** stale są nieważne, należy skontaktować się z miejscowym biurem firmy Roche w celu uzyskania pomocy technicznej.

Ograniczenia metody

1. Do badań należy używać wyłącznie określonych rodzajów próbek. Potwierdzono możliwość używania testu **cobas EGFR** z próbkami osocza oddzielonego od krwi pobranej do probówek Roche cfDNA lub K2 EDTA.
2. Skuteczność testu **cobas EGFR Test** została zatwierdzona przy użyciu zestawu **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit**.
3. Detekcja mutacji zależy od liczby kopii obecnych w próbce, na którą wpływać może integralność próbki, ilość wyizolowanego DNA i obecność substancji zakłócających detekcję.
4. Wiarygodność wyników zależy od odpowiedniego transportu, przechowywania i przetwarzania. Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku operatora systemu **cobas® 4800 System** lub podręczniku użytkownika **cobas® 4800 System**.
5. Pipetowanie ze spodu probówki do elucji może spowodować zniszczenie peletki i niekorzystnie wpłynąć na wyniki testu.
6. Dodanie do odczynnika Master Mix testu **cobas EGFR Test** enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak dla uniknięcia zanieczyszczenia odczynników konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji użytkowania.
7. Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemów **cobas® 4800 System**.

8. Do użycia z tym produktem został zatwierdzony wyłącznie analizator **cobas z 480**. Z tym produktem nie wolno używać żadnego innego termocyklera z systemem optycznym do detekcji w czasie rzeczywistym.
9. Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badanie korelacji stosowanych metod w celu określenia technologicznych różnic występujących pomiędzy nimi.
10. Obecność inhibitorów PCR może prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych lub nieważnych.
11. Mutacje w obrębie regionów genomowego DNA tworzącego gen kodujący EGFR, z którymi wiążą się primery i/lub sondy używane w teście **cobas EGFR Test**, chociaż rzadkie, mogą spowodować niewykrycie obecności mutacji w eksonach 18, 19, 20, 21 (wyniki „No Mutation Detected”).
12. Test **cobas EGFR Test** wykazuje reaktywność krzyżową (wyniki „Mutation Detected”) z mutacją L747S w eksonie 19, rzadką mutacją nabytą, która może odpowiadać za oporność na leczenie TKI.¹⁹
13. Próbkki badane przy wysokich stężeniach ($>10^5$ kopii/ml) mogą generować wyniki fałszywe.
14. Test **cobas EGFR Test** został zwalidowany do zastosowania z użyciem 25 µl roztworu podstawowego DNA na dołek reakcyjny. Nie zaleca się stosowania początkowych objętości roztworu podstawowego DNA w ilości mniejszej niż 25 µl w każdym dołku reakcyjnym.
15. Opisana wyżej procedura musi być przestrzegana, aby wykrywać ≥ 100 kopii DNA mutantu na ml osocza oddzielonego od krwi pobranej do próbowki Roche cfDNA lub K2 EDTA w przypadku mutacji EGFR (Tabela 3).
16. Próbkki z wynikami oznaczonymi jako „No Mutation Detected” mogą zawierać mutacje w genie EGFR niewykrywane przez to oznaczenie.
17. Należy rozważyć, czy wynik „No Mutation Detected” dla osocza należy powtórzyć, czy potwierdzić przez badania tkanki.
18. Osocze pochodzące z krwi pełnej pobranej do próbowki Roche cfDNA wystarcza wyłącznie na przeprowadzenie jednego testu.
19. Nie należy łączyć osocza z próbek, które nie zostały pobrane od pacjentów w tym samym momencie.
20. Nie określono wiarygodności testu **cobas EGFR** z pobranymi do próbowki Roche cfDNA próbkami zawierającymi skrzepy. Zawierające skrzepy próbki należy odrzucić i pobrać od pacjenta nową próbkę.
21. W próbkach osocza oddzielonych od krwi pobranej do próbowek Roche cfDNA zaobserwowano występowanie hemolizy. Hemoglobina w stężeniu $> 2,0$ g/l może zakłócać działania testu **cobas EGFR**.

Niekliniczna ocena wiarygodności

Skuteczność analityczna

Następujące dane mają wykazywać skuteczność analityczną testu **cobas** EGFR Test.

Czułość analityczna — granica ślepej próby

W celu oceny skuteczności testu **cobas** EGFR Test przy braku matrycy i zapewnienia, że ślepa próba nie generuje sygnału analitycznego, który może wskazywać na niskie stężenie mutacji, oceniano próbki osocza od zdrowych dawców pobranego na K2 EDTA z naturalnie występującym genem kodującym EGFR. Wykorzystując analizę zaleconą w wytycznych CLSI EP17-A2²⁰, granicę próby ślepej określono jako zero dla wszystkich mutacji.

Granica wykrywalności przy użyciu DNA linii komórkowych

Osocze pobrane na K2 EDTA

DNA linii komórkowych zawierający każdą z siedmiu klas mutacji wykrywanych przez test dodano do osocza K2 EDTA od zdrowego dawcy, typu dzikiego dla EGFR. Przygotowano seryjne rozcieńczenia i zbadano 24 powtórzenia każdego elementu panelu z użyciem każdej z trzech serii zestawów **cobas** EGFR.

Granice wykrywalności określono dla każdej z siedmiu klas mutacji wykrywanych przez test jako najniższe stężenia DNA, które dawały wynik EGFR „Mutation Detected” z częstością przynajmniej 95% dla badanej mutacji. Wyniki przedstawia Tabela 24.

Tabela 24 Granica wykrywalności testu cobas EGFR przy użyciu osocza K2 EDTA

Ekson genu kodującego EGFR	Grupa mutacji EGFR	Sekwencja kwasu nukleinowego genu kodującego EGFR	Granica wykrywalności nienaruszonego* DNA (kopie/ml)	Granica wykrywalności pofragmentowanego** DNA (kopie/ml)	Identyfikator COSMIC ¹⁴
18	G719A	2156G>C	100	100	6239
19	Ex19Del	2235_2249del15	25	75	6223
20	T790M	2369C>T	25	100	6240
20	S768I	2303G>T	20	25	6241
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	80	25	12376
21	L858R	2573T>G	10	100	6224
21	L861Q	2582T>A	30	30	6213

Różnice w obserwowanej granicy wykrywalności wynikały z różnic DNA tła.

* Nienaruszony DNA linii komórkowej miał tło DNA typu dzikiego wynoszące około 10 000 kopii/ml.

** DNA linii komórkowych pofragmentowany mechanicznie na fragmenty o średniej wielkości 220 pz miał tło naturalnie występującego DNA wynoszące około 100 000 kopii/ml.

Osocze pobrane do próbowki Roche cfDNA

W przypadku osocza oddzielonego od krwi pobranej do próbowki Roche cfDNA, wartości LoD zweryfikowano poprzez dodanie pofragmentowanego DNA linii komórkowych zawierającego każdą z siedmiu klas mutacji wykrywanych przez test do pobranego od zdrowego dawcy do próbowki Roche cfDNA osocza, typu dzikiego dla EGFR. Przygotowano rozcieńczenia ukierunkowane na stężenia LoD podane w Tabela 24, a 20 powtórzeń każdej próbki przetestowano przy użyciu jednej serii zestawów testu **cobas** EGFR. Zaobserwowany odsetek trafności dla każdej mutacji wyniósł 100%.

Podsumowując, test **cobas** EGFR umożliwia wykrywanie mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu kodującego EGFR przy ≤ 100 kopiach DNA mutanta na ml osocza z zastosowaniem standardowej początkowej objętości 25 μ l podstawowego roztworu DNA na dołek reakcyjny przy użyciu osocza pobranego do próbówki Roche cfDNA lub K2 EDTA.

Reaktywność krzyżowa z innymi mutacjami w eksonach 18, 19, 20 i 21

Próbki z przedłużenia badania AURA oraz badania klinicznego AURA2

Test **cobas** EGFR Test dał wyniki „Mutation Detected” dla następujących mutacji w genie EGFR obserwowanych w przypadku próbek z przedłużenia badania AURA i badania klinicznego AURA2 (Tabela 25). Przedłużenie badania AURA miało na celu uzupełnienie próbek w kohorcie badania AURA2 i zwiększenia prawdopodobieństwa wykrycia rzadkich mutacji w osoczu. Skuteczność analityczna testu **cobas** EGFR Test w wykrywaniu tych mutacji nie została oceniona.

Tabela 25 Mutacje obserwowane w przedłużeniu badania AURA i badaniu AURA2 określone jako reagujące krzyżowo w teście **cobas** EGFR Test

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Nie stwierdzono
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Nie stwierdzono
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Nie stwierdzono

Swoistość — mikroorganizm

Swoistość testu **cobas** EGFR Test oceniano, badając bakterie *Staphylococcus epidermidis* w ilości 1×10^6 jednostek tworzących kolonie i stwierdzono, że mikroorganizm ten nie reaguje krzyżowo ani nie zakłóca działania testu **cobas** EGFR Test po dodaniu do osocza od zdrowego dawcy pobranego na K2 EDTA, zawierającego naturalnie występujące i zmutowane sekwencje genu EGFR.

Substancje wpływające na wynik testu

Osocze pobrane na K2 EDTA

Wykazano, że triglicerydy (37 mM, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹), 0,2 g/l bilirubiny (niezwiązanej lub związanej, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹) i hemoglobina (1,5 g/l) nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR Test w przypadku dodania potencjalnej substancji zakłócającej do próbek osocza od zdrowych dawców pobranych na K2 EDTA, zawierających naturalnie występujące i zmutowane sekwencje genu EGFR. Wykazano, że hemoglobina w stężeniu 2,0 g/l w osoczu zakłóca działanie testu **cobas** EGFR Test. Albumina w stężeniu ≥ 60 g/l (60 g/l, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹) może zakłócać działanie testu **cobas** EGFR Test.

Wyniki badania wykazują, że EDTA oraz produkty lecznicze Neupogen i TARCEVA® nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR Test w przypadku dodania potencjalnej substancji zakłócającej do próbek osocza od zdrowych dawców pobranych na K2 EDTA, zawierających naturalnie występujące oraz zmutowane sekwencje genu EGFR.

Osocze pobrane do próbki Roche cfDNA

Wykazano, że triglicerydy (37 mM, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹), 0,2 g/l bilirubiny (niezwiązanej lub związanej, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹), hemoglobina (2,0 g/l) i albumina (60 g/l, granica podwyższonego stężenia zalecana przez CLSI²¹) nie zakłócają działania testu **cobas** EGFR w przypadku dodania potencjalnej substancji zakłócającej do próbek osocza od zdrowych dawców pobranych do próbki Roche cfDNA, zawierających naturalnie występujące i zmutowane sekwencje genu EGFR.

LiniowośćOsocze pobrane na K2 EDTA

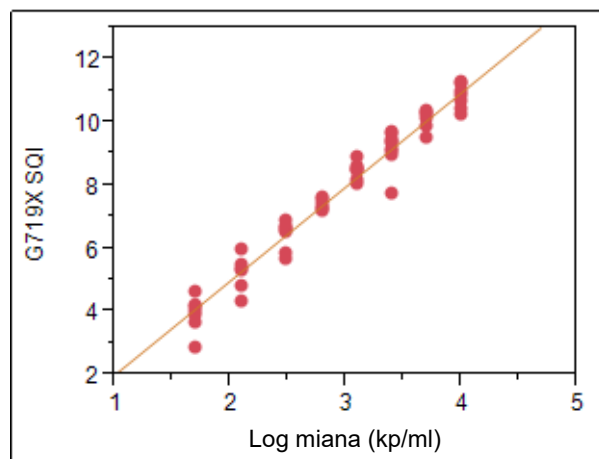
Badanie liniowości testu **cobas** EGFR Test przeprowadzono za pomocą serii rozcieńczeń przynajmniej 8 elementów panelu obejmujących zakres liniowości dominującej mutacji w każdej klasie mutacji w genie EGFR raportowanych przez test. Elementy panelu zostały przygotowane przez rozcieńczenie DNA linii komórkowych zawierających każdą z dominujących mutacji w zdrowym osoczu K2 EDTA, będącym typem dzikim dla EGFR. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi CLSI Guideline EP-06A.²⁴ Zbadano dziesięć powtórzeń na element panelu dla każdej z 2 serii dla stężeń do 1,0E+04 kopii/ml (łącznie 20 powtórzeń na poziom). Powyżej 1,0E+04 kopii/ml badano jedno powtórzenie na serię.

Dla każdej klasy mutacji testu **cobas** EGFR zakres liniowości wskazuje Tabela 26 i odpowiednie wykresy dla jednej serii przedstawiają Ryc. 8 do Ryc. 14.

Tabela 26 Zakres liniowości testu cobas EGFR przy użyciu osocza K2 EDTA

Ekson genu kodującego EGFR	Mutacja genu kodującego EGFR	Sekwencja docelowa kwasu nukleinowego	Zakres liniowości (kopie/ml)
18	G719A	2156G>C	50–1E+04
19	Delecja w eksonie 19	2235_2249del15	10–1E+05
20	S768I	2303G>T	10–1E+05
20	T790M	2369C>T	50–1E+05
20	Insercja w eksonie 20	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10–1E+05
21	L858R	2573T>G	10–1E+05
21	L861Q	2582T>A	10–1E+05

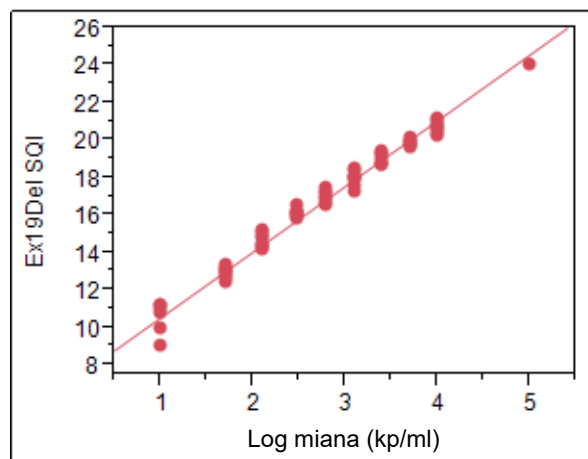
Ryc. 8 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej G719A



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

$$R^2 = 0,968$$

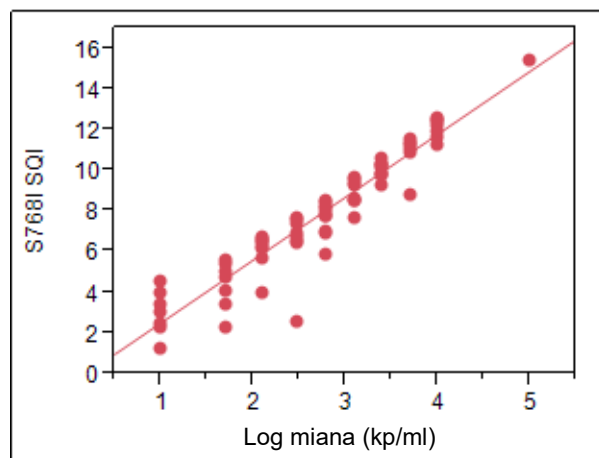
Ryc. 9 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej Ex19 Del



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

$$R^2 = 0,981$$

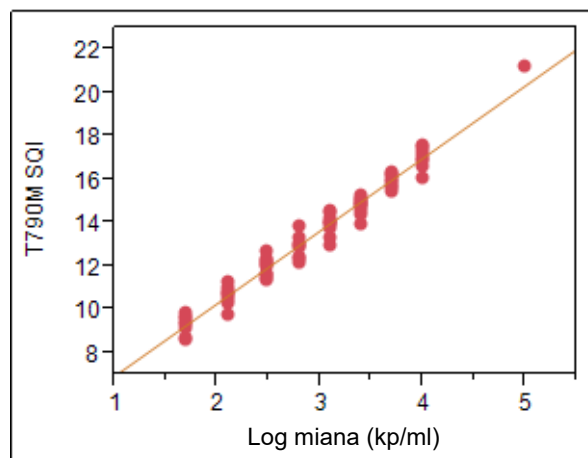
Ryc. 10 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej S768I



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

$$R^2 = 0,912$$

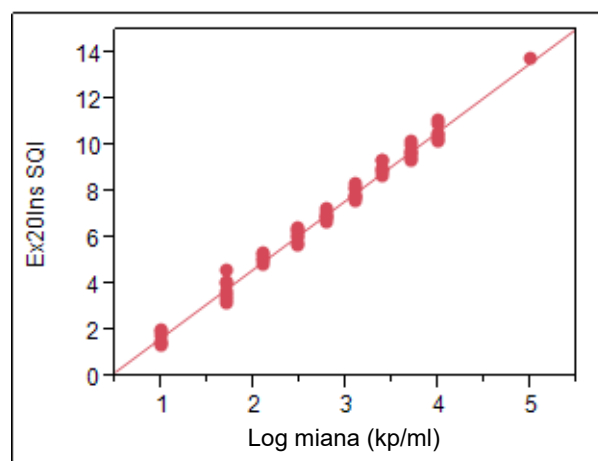
Ryc. 11 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej T790M



$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \log \text{kopii na ml}$$

$$R^2 = 0,973$$

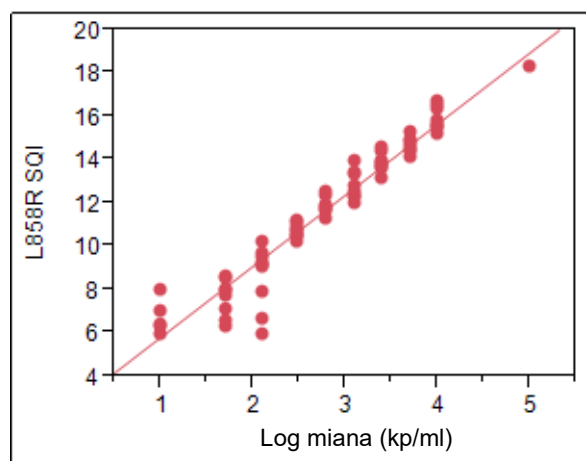
**Ryc. 12 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej Ex20Ins**



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

$$R^2 = 0,990$$

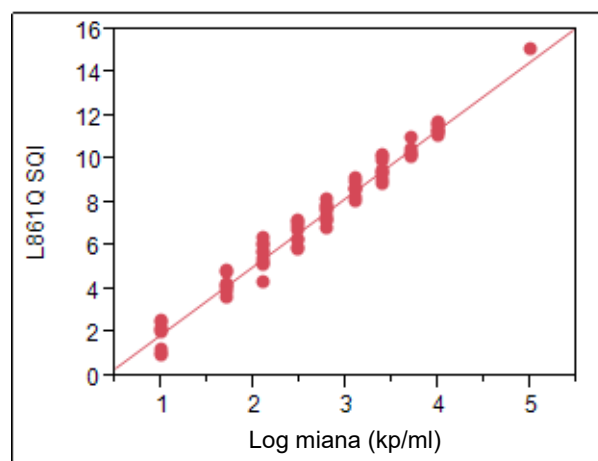
**Ryc. 13 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej L858R**



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

$$R^2 = 0,933$$

**Ryc. 14 Liniowość DNA mutanta w osoczu K2 EDTA:
DNA linii komórkowej L861Q**



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

$$R^2 = 0,980$$

Osocze pobrane do próbówki Roche cfDNA

Badanie liniowości próbek osocza pobranych do próbówki Roche cfDNA zweryfikowano za pomocą serii rozcieńczeń przynajmniej 6 elementów panelu obejmujących zakres liniowości określony przy użyciu próbek osocza pobranych na K2 EDTA (Tabela 26). Elementy panelu zostały przygotowane przez rozcieńczenie pofragmentowanego DNA linii komórkowych zawierających każdą z dominujących mutacji w pobranym do próbówki Roche cfDNA zdrowym osoczu, będącym typem dzikim dla EGFR. Ocenę przeprowadzono według wytycznych EP06-AE CLSI.²⁴ Zbadano cztery powtórzenia na element panelu dla każdej z 2 serii dla stężeń do 1,0E+04 kopii/ml (łącznie 8 powtórzeń na poziom). Powyżej 1,0E+04 kopii/ml badano dwa powtórzenia na serię (łącznie 4 powtórzenia na poziom).

Powtarzalność

Powtarzalność testu **cobas** EGFR Test oceniono, wykorzystując panel dwunastu próbek składający się z rozcieńczeń DNA linii komórkowej mutanta EGFR rozcieńczonego w próbkach osocza K2 EDTA od zdrowego dawcy. Dominująca mutacja w każdej klasie raportowanej przez test była jednocześnie rozcieńczana do jedenastu próbek i oceniana przy 3-krotności granicy wykrywalności odpowiedniej mutacji (w kopiach/ml), 1,0E+03 kopii/ml i 5,0E+04 kopii/ml. Dodatkowo badano jedną próbkę typu dzikiego. Każdą z dwunastu próbek badało dwukrotnie dwóch operatorów, używając dwóch różnych serii odczynników przez 4 dni na dwóch analizatorach **cobas** z 480 (N = 32 na próbkę). Odsetek prawidłowych rozpoznań testu **cobas** EGFR wyniósł 99,2% (381/384).

Tabela 27 wymienia średni SQI oraz odchylenie standardowe SQI z badania powtarzalności. Wszystkie 32 powtórzenia próbki naturalnie występującej sekwencji dały oczekiwany wynik „No Mutation Detected”.

Tabela 27 Średni SQI oraz odchylenie standardowe SQI z badania powtarzalności

Ekson genu kodującego EGFR	Mutacja genu kodującego EGFR	Sekwencja docelowa kwasu nukleinowego	Stężenie (kopie/ml)	Średnie SQI	Odchylenie standardowe 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
Naturalnie występujący gen EGFR			0	NMD	NMD

NMD = No Mutation Detected (Nie wykryto mutacji)

Ocena klinicznej skuteczności testu

Powtarzalność kliniczna z osoczem pobranym na K2 EDTA

Przeprowadzono badanie w celu oceny odtwarzalności testu **cobas** EGFR Test między 3 ośrodkami badawczymi (2 zewnętrzne i 1 wewnętrzny, 2 operatorów na ośrodek), 3 seriami odczynników przez 3 niekolejne dni badania z dziewięcioelementowym panelem spreparowanych próbek zawierających DNA linii komórek rozcieńczony w osoczu NSCLC. Mutacje obejmujące jedną mutację G719X w eksonie 18, jedną delecję w eksonie 19, dwie mutacje T790M w eksonie 20, jedną insercję w eksonie 20, jedną mutację L858R w eksonie 21 i jedną mutację L861Q w eksonie 21 były reprezentowane w czterech spreparowanych próbkach, co podsumowano w Tabeli 28. Każda spreparowana próbka została przygotowana w dwóch stężeniach wynoszących około 100 kopii/ml i 300 kopii/ml. Te spreparowane próbki wbudowano do ośmiu oddzielnych elementów panelu wraz z kontrolą naturalnie występującej sekwencji, aby przygotować dziewięcioelementowy panel.

Tabela 28 Kombinacje mutacji próbek spreparowanych

Kombinacja 1 DNA linii komórek	Kombinacja 2 DNA linii komórek	Kombinacja 3 DNA linii komórek	Kombinacja 4 DNA linii komórek
Del. w eksonie 19	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Insercja w eksonie 20

Ogólnie przeprowadzono 37 cykli pracy z 36 ważnymi cyklami pracy i jednym nieważnym. Łącznie zbadano 648 paneli (lub 1224 mutacje), z których 646 paneli (lub 1220 mutacji) miało ważne wyniki. W 72 ważnych testach dla elementów panelu naturalnie występujących sekwencji nie było wyników „Mutation Detected”, co skutkowało 100% zgodnością. Zgodność różni się dla elementów panelu mutacji: w przypadku ośmiu uzyskano 100% zgodność, dla pięciu zgodność > 97%, a w przypadku jednej mutacji (G719X) zgodność była niższa i wynosiła około 90%. Wyniki dotyczące zgodności całkowitej wg mutacji przedstawia Tabela 29. Współczynnik zmienności (CV) wyniósł ≤ 12,8% w przypadku wszystkich elementów panelu mutacji. Dla kontroli wewnętrznej i mutacji ogólna wartość CV wyniosła ≤ 1,5%. Wartość CV wyniosła ≤ 0,89% między seriami i ≤ 1,47% w ramach serii.

Tabela 29 Ogólne oszacowania zgodności wg elementu panelu mutacji w badaniu powtarzalności

Element panelu mutacji	Liczba ważnych testów	Zgodność N	Odsetek zgodności (95% CI) ^a
Naturalnie występująca — nd.	72	72	100 (95,0, 100,0)
G719A w eksonie 18 — 100 kopii/ml	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
Delecja (2235_2249del15) w eksonie 19 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Insercja (2307_2308ins9) w eksonie 20 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
S768I w eksonie 20 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 100 kopii/ml	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
L858R w eksonie 21 — 100 kopii/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
L861Q w eksonie 21 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
G719A w eksonie 18 — 300 kopii/ml	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Delecja (2235_2249del15) w eksonie 19 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Insercja (2307_2308ins9) w eksonie 20 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
S768I w eksonie 20 — 300 kopii/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 300 kopii/ml	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
L858R w eksonie 21 — 300 kopii/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
L861Q w eksonie 21 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)

^a 95% CI = 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

^b Niższa zgodność dla tej próbki była spowodowana głównie wielokrotnymi pominiętymi rozpoznaniem (n = 6/24 powtórzeń łącznie) występującymi głównie w jednym z trzech ośrodków.

Uwaga: wyniki uznawano za zgodne, gdy dla elementu panelu mutacji uzyskano ważny wynik „Mutation Detected” lub gdy dla elementu panelu sekwencji występujących naturalnie uzyskano ważny wynik „No Mutation Detected”.

Uwaga: próbki stosowane w tym badaniu składały się z DNA linii komórkowych pofragmentowanego mechanicznie na fragmenty o średniej wielkości 220 pz i miały tło naturalnie występującego DNA wynoszące około 12 000 kopii/ml.

Powtarzalność kliniczna z osoczem pobranym do próbki Roche cfDNA

Przeprowadzono badanie w celu oceny powtarzalności testu **cobas** EGFR Test między 3 ośrodkami badawczymi (2 zewnętrzne i 1 wewnętrzny, 2 operatorów na ośrodek), jedną serią odczynników przez 3 niekolejne dni badania z trzema dziewięcioelementowymi panelami spreparowanych próbek zawierających DNA linii komórek rozcieńczony w trzech unikatowych pulach osocza pochodzącego od zdrowych dawców. Próbkę zawartą w każdej puli pobrano przy użyciu unikatowej serii próbek Roche cfDNA. W każdym ośrodku przetestowano dwa panele osocza. Mutacje obejmujące jedną mutację G719X w eksonie 18, jedną delecję w eksonie 19, jedną mutację T790M w eksonie 20, jedną insercję w eksonie 20, jedną mutację L858R w eksonie 21 i jedną mutację L861Q w eksonie 21 były reprezentowane w czterech spreparowanych próbkach, co podsumowano w Tabeli 30. Każda spreparowana próbka została przygotowana w dwóch stężeniach wynoszących około 100 kopii/ml i 300 kopii/ml. Te spreparowane próbki wbudowano do ośmiu oddzielnych elementów panelu wraz z kontrolą naturalnie występującej sekwencji, aby przygotować dziewięcioelementowy panel.

Tabela 30 Kombinacje mutacji próbek spreparowanych

Kombinacja 1 DNA linii komórek	Kombinacja 2 DNA linii komórek	Kombinacja 3 DNA linii komórek	Kombinacja 4 DNA linii komórek
Del. w eksonie 19	S768I	T790M	L858R
Ins. w eksonie 20	G719A	L861Q	Brak danych

Łącznie wykonano 36 cykli pracy i wszystkie z nich były ważne. Łącznie zbadano 648 paneli, z których 646 paneli (lub 1220 mutacji) miało ważne wyniki. W 72 ważnych testach dla elementów panelu naturalnie występujących sekwencji uzyskano jeden wynik „Mutation Detected”, co skutkowało 98,6% zgodnością. Zgodność różni się dla elementów panelu mutacji: w przypadku trzynastu uzyskano 100% zgodność, dla jednego > 98%. Wyniki dotyczące zgodności całkowitej wg mutacji przedstawia Tabela 31. Współczynnik zmienności (CV) wyniósł ≤ 13,7% w przypadku wszystkich elementów panelu mutacji. Dla kontroli wewnętrznej i mutacji ogólna wartość CV wyniosła ≤ 1,3%.

Tabela 31 Ogólne oszacowania zgodności wg elementu panelu mutacji w badaniu powtarzalności

Element panelu mutacji	Liczba ważnych testów	Zgodność N	Odsetek zgodności (95% CI) ^a
Naturalnie występująca — nd.	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
G719A w eksonie 18 — 100 kopii/ml	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Delecja (2235_2249del15) w eksonie 19 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Insercja (2307_2308ins9) w eksonie 20 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
S768I w eksonie 20 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
L858R w eksonie 21 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
L861Q w eksonie 21 — 100 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
G719A w eksonie 18 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
Delecja (2235_2249del15) w eksonie 19 — 300 kopii/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
Insercja (2307_2308ins9) w eksonie 20 — 300 kopii/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
S768I w eksonie 20 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 300 kopii/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)
L858R w eksonie 21 — 300 kopii/ml	72	72	100 (95,0, 100,0)
L861Q w eksonie 21 — 300 kopii/ml	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a 95% CI = 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

Uwaga: wyniki uznawano za zgodne, gdy dla elementu panelu mutacji uzyskano ważny wynik „Mutation Detected” lub gdy dla elementu panelu sekwencji występujących naturalnie uzyskano ważny wynik „No Mutation Detected”.

Granica wykrywalności (LoD) przy użyciu próbek osocza NSCLC

Przeprowadzono badanie w celu potwierdzenia LoD przy użyciu próbek osocza K2 EDTA NSCLC dla trzech delecji, jednej mutacji L858R i jednej mutacji T790M w eksonie 19 przy użyciu testu **cobas** EGFR między trzema ośrodkami badawczymi (dwoma zewnętrznymi i jednym wewnętrznym, dwóch operatorów na ośrodek), trzema seriami odczynników i dwoma niekolejnymi dniami z 11-elementowym panelem próbek osocza NSCLC (każdy po pięć mutacji z dwoma poziomami: 1 × LoD i 2 × LoD; plus sekwencja występująca naturalnie). Ogółem przeprowadzono 12 cykli pracy (dwa powtórzenia na cykl pracy) i wszystkie cykle pracy były ważne. Ogółem dla każdego z 11 elementów panelu wykonano 264 testy, z czego 262 (99,2%) testy były ważne. W 23 ważnych testach dla elementów panelu naturalnie występujących sekwencji nie było wyników „Mutation Detected”, co skutkowało 100% zgodnością. Procent zgodności dla T790M — 1 × LoD w eksonie 20 wynosi 95,8% i 100% dla wszystkich innych elementów panelu mutacji. Oszacowaną zgodność według elementu panelu podsumowuje Tabela 32. Współczynnik zmienności (CV) wyniósł < 7,0% w przypadku wszystkich elementów panelu mutacji.

Tabela 32 Oszacowana zgodność wg elementu panelu

Człon panelu	Liczba ważnych testów	Zgodność N	Odsetek zgodności (95% CI) ^a
Naturalnie występująca — nd.	23	23	100 (85,2, 100,0)
Delecja 1 w eksonie 19 — 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Delecja 1 w eksonie 19 — 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Delecja 2 w eksonie 19 — 1 × LoD	23	23	100 (85,2, 100,0)
Delecja 2 w eksonie 19 — 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Delecja 3 w eksonie 19 — 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
Delecja 3 w eksonie 19 — 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
T790M w eksonie 20 — 1 × LoD	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
T790M w eksonie 20 — 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
L858R w eksonie 21 — 1 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)
L858R w eksonie 21 — 2 × LoD	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a 95% CI = 95% przedział ufności na podstawie dokładnej metody dwumianowej.

Uwaga: wyniki są uznawane za zgodne, gdy ważny test elementu panelu mutacji ma wynik w postaci „Mutation Detected” lub gdy ważny test elementu panelu naturalnie występujących sekwencji ma wynik „No Mutation Detected”.

Uwaga: próbki kliniczne stosowane w tym badaniu miały tło naturalnie występującego DNA wynoszące około 24 000 kopii/ml.

Korelacja osocza pobranego do próbki Roche cfDNA z osoczem pobranym na K2 EDTA

Skuteczność testu **cobas** EGFR z osoczem pobranym na K2 EDTA i do próbki Roche cfDNA porównano poprzez przetestowanie panelu próbek, który obejmował sparowane pobrania od 34 pacjentów z NSCLC EGFR typu dzikiego, 17 pacjentów z NSCLC EGFR z dodatnim wynikiem dla mutacji i 20 zdrowych dawców. Probki pobrane od zdrowych dawców zostały wykorzystane do stworzenia próbek zastępczych składających się z połączenia pofragmentowanego DNA linii komórkowych zawierających dominujące mutacje zgłaszane przez test **cobas** EGFR oraz krwi pełnej pobranej do próbek z K2 EDTA i próbek Roche cfDNA. Do próbek zastępczych dodano pofragmentowane DNA linii komórkowych w ilości wynoszącej w przybliżeniu $1,5 \times \text{LoD}$ dla każdej mutacji zgodnie z ustaleniami przy użyciu osocza pobranego na K2 EDTA (Tabela 24). Status mutacji potwierdzono dla każdego pacjenta NSCLC przy użyciu metody NGS. Wszystkie próbki przetestowano przy użyciu jednej serii odczynników testu **cobas** EGFR. Dla wszystkich próbek uzyskano ważne wyniki, a wyniki porównania przedstawia Tabela 33.

Tabela 33 Analiza zgodności pomiędzy osoczem pobranym na K2 EDTA i osoczem pochodzącym z próbek Roche cfDNA

		Probówka z K2 EDTA		Ogółem		
		MD	NMD			
Probówka Roche cfDNA	MD	37	0	37	Zgodność wyników dodatnich (%): 95% CI	100% 90,5–100%
	NMD	0	34	34	Zgodność wyników ujemnych (%): 95% CI	100% 89,7–100%
	Ogółem	37	34	71	Całkowita zgodność (%): 95% CI	100% 94,5–100%

Gdzie: MD = Mutation Detected i NMD = No Mutation Detected

Zgodność pomiędzy sparowanymi próbkami dla osocza pobranego na K2 EDTA oraz osocza pochodzącego z próbek firmy Roche do pobierania DNA pozakomórkowego Roche Cell-Free DNA Collection Tube wynosiła 100%. Nie zaobserwowano niezgodnych wyników.

W próbkach osocza z badania test **cobas** EGFR pozwolił na wykrycie następujących mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR, które wymienia Tabela 34. O ile nie podano inaczej, mutacje zaobserwowano w próbkach NSCLC.

Tabela 34 Mutacje zaobserwowane w korelacji osocza pobranego do próbki Roche cfDNA z osoczem pobranym na K2 EDTA

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
18	2156G>C*	G719A	6239
	2155G>A§	G719S	6252
19	2235_2249del15 ⁺	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15§	E746_A750delELREA	6225
	2219_2236dup TTCCCGTCGCTATCAAGG§	K745_E746insVPVAIK	6963938
	2237_2248del12§	E746_E749delELRE	Nie stwierdzono
	2237_2251del15§	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC§	L747P	24267
	2251A>C§	T751P	Nie stwierdzono
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Zaobserwowano wyłącznie w próbce zastępczej

⁺ Zaobserwowano w próbce zastępczej i próbce NSCLC

§ Zaobserwowano wyłącznie w próbce NSCLC

Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki osocza z kohorty badania fazy III ASPIRATION

Dokładność analityczna testu **cobas** EGFR Test w wykrywaniu delecji w eksonie 19 i mutacji L858R oceniono przez porównanie ze zwalidowaną platformą sekwencjonowania nowej generacji (NGS) przy użyciu pobranych na K2 EDTA próbek osocza pochodzących od pacjentów z zaawansowanym NSCLC z jednego lub większej liczby następujących badań (kohorta ASPIRATION): badania kliniczne firmy Genentech G027821 (MetMab) i G027761 (MetLung) wraz z badaniem klinicznym firmy Roche ML25637 (ASPIRATION).

Sto dwadzieścia osiem próbek osocza o objętości 2 ml i z ważnymi sparowanymi wynikami z testu **cobas** EGFR Test w próbkach osocza, jak i metody NGS przy użyciu próbek osocza uwzględniono w analizie zgodności dla delecji w eksonie 19 lub mutacji L858R w genie EGFR. Łącznie 32 próbki dało wynik MD, a 95 miało wynik NMD wg metody NGS. Wartość PPA między testem **cobas** EGFR Test w osoczu i NGS w osoczu wynosiła 87,5% (95% CI: 71,9%, 95,0%); wartość NPA między testem **cobas** EGFR i NGS wynosiła 96,8% (95% CI: 91,1%, 98,9%), co przedstawiono w Tabeli 35.

Tabela 35 Porównanie testu cobas EGFR Test w osoczu z sekwencjonowaniem metodą NGS w celu wykrycia delekcji w eksonie 19 oraz L858R genu EGFR

Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	87,5% (28/32)	71,9%, 95,0%
Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	96,8% (92/95)	91,1%, 98,9%

Korelacja między próbkami osocza i tkanki wg testu cobas EGFR Test pod względem wykrywania delekcji w eksonie 19 i L858R przy użyciu próbek z badania fazy III ENSURE

Badanie ENSURE (YO25121) było wieloośrodkowym, randomizowanym badaniem fazy III prowadzonym metodą otwartej próby w celu oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowania TARCEVA® (erlotynib) porównaniu z gemcytabiną/cisplatyną w ramach leczenia pierwszej linii pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NSCLC) w stadium IIIB/IV i z delekcją w eksonie 19 lub mutacją L858R w domenie kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Epidermal Growth Receptor*, EGFR) w komórkach nowotworowych. Badaniu przesiewowemu poddano łącznie 647 pacjentów. 601 pacjentów miało ważny wynik dla delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R w genie EGFR w teście cobas EGFR Test z tkanki, a randomizacji w ramach badania poddano 217 pacjentów.

W przypadku pięciuset siedemnastu pacjentów (86,0%, 517/601) dostępne były dopasowane próbki osocza pobrane na K2 EDTA i próbki tkanek, a objętość próbki osocza wynosząca $\geq 2,0$ ml, tj. objętość próbki zatwierdzoną do stosowania w teście cobas EGFR Test w osoczu, stwierdzono w przypadku 441 pacjentów.

Korelację pomiędzy wynikami próbek osocza i tkanki w teście cobas EGFR Test w odniesieniu do wykrywania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R oceniano zarówno oddzielnie, jak i łącznie. W analizie zgodności uwzględniono łącznie 431 próbek ze sparowanymi wynikami w teście cobas EGFR Test zarówno z próbek tkanki, jak i osocza. Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA) między próbkami osocza i tkanki wynosiła 76,7% (95% CI: od 70,5% do 81,9%), natomiast zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA) wynosiła 98,2% (95% CI: od 95,4% do 99,3%) w odniesieniu do wykrywania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R łącznie, co przedstawia Tabela 36. Wartości PPA, NPA i OPA dla wykrywania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R oddzielnie przedstawia również Tabela 36.

Tabela 36 Zgodność między wynikami próbek osocza i tkanki w teście cobas EGFR Test w odniesieniu do wykrywania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R

Mutacja	Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Łącznie	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	76,7% (161/210)	70,5%, 81,9%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	98,2% (217/221)	95,4%, 99,3%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	87,7% (378/431)	84,2%, 90,5%
Delekcja w eksonie 19	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	80,8% (97/120)	72,9%, 86,9%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	98,7% (307/311)	96,7%, 99,5%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	93,7% (404/431)	91,0%, 95,7%
L858R	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	67,8% (61/90)	57,6%, 76,5%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	99,1% (338/341)	97,4%, 99,7%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	92,6% (399/431)	89,7%, 94,7%

Uwaga: wartości PPA i NPA obliczono, wykorzystując tkankę jako punkt odniesienia.

Obliczono również wartość predykcyjną dodatnią (PPV) i wartość predykcyjną ujemną (NPV) dla wykrywania delekcji w eksonie 19 i mutacji L858R łącznie z wykorzystaniem metody typu bootstrap opartej na różnym występowaniu tkanek populacji (Tabela 37). Zgodnie z oczekiwaniami w miarę wzrostu częstości występowania mutacji w genie EGFR wartość PPV rośnie, a NPV spada. W przypadku populacji pacjentów rasy białej, w której zakłada się częstość występowania

07340761001-08PL

mutacji w genie EGFR na poziomie 10–15%, zakres PPV wynosi od 82,8% do 88,6%, natomiast zakres NPV to 96,0–97,4%. W przypadku oparcia się na częstości występowania w populacji azjatyckiej, przy założeniu częstość występowania mutacji w genie EGFR na poziomie 30–50%, zakres PPV wynosi od 94,8% do 97,8%, natomiast zakres NPV to 80,8–90,9%.

Tabela 37 Szacunkowe wartości prognostyczne dla testu cobas EGFR Test w próbkach tkanki i testu cobas EGFR Test w próbkach osocza (pacjenci z próbkami osocza o objętości $\geq 2,0$ ml) na podstawie różnej częstości występowania mutacji w genie EGFR

Zakładana częstość występowania mutacji w genie EGFR na podstawie próbek tkanki	Dodatnia wartość predykcyjna (PPV)	Ujemna wartość predykcyjna (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%)

Uwaga: 95% przedziały ufności obliczono metodą typu bootstrap.

Uwaga: wyniki 79 próbek o objętościach < 2,0 ml traktowano w tej analizie jako nieważne.

Uwaga: wartości PPV i NPV obliczono, wykorzystując osocze jako punkt odniesienia.

Korelacja z metodą referencyjną wykorzystującą próbki z badania fazy II AURA2

Skuteczność kliniczna testu **cobas** EGFR Test została oceniona przez jego porównanie ze zwalidowaną platformą sekwencjonowania nowej generacji (NGS) przy użyciu pobranych na K2 EDTA próbek osocza pochodzących od pacjentów z zaawansowanym NSCLC, którzy zostali poddani badaniu przesiewowemu w ramach badania fazy II AURA2 dotyczącego produktu leczniczego TAGRISSO®.²³

Spośród 383 pacjentów kwalifikujących się do udziału w przypadku 344 dostępne były próbki osocza, które przebadano za pomocą testu **cobas** EGFR Test i uzyskano 342 wyniki ważne oraz dwa wyniki nieważne. Spośród łącznie 344 próbek osocza przebadanych za pomocą testu **cobas** EGFR Test w przypadku 322 (93,6%) zastosowano również metodę NGS, a objętość 22 próbek osocza była niewystarczająca do zbadania metodą NGS.

Oceniono dokładność analityczną testu **cobas** EGFR Test w porównaniu z metodą referencyjną, NGS, w odniesieniu do detekcji mutacji T790M w próbkach osocza. W analizie zgodności uwzględniono łącznie 320 próbek z ważnymi sparowanymi wynikami zarówno testu **cobas** EGFR Test, jak i sekwencjonowania metodą NGS. Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA) między testem **cobas** EGFR Test i NGS wynosiła 91,5% (95% CI: od 85,7% do 95,1%), natomiast zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA) wynosiła 91,1% (95% CI: od 86,0% do 94,4%) w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M, co przedstawia Tabela 38.

Tabela 38 Porównanie testu cobas EGFR Test w próbkach osocza z sekwencjonowaniem metodą NGS w celu wykrywania mutacji T790M w genie EGFR

Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	91,5% (129/141)	85,7%, 95,1%
Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	91,1% (163/179)	86,0%, 94,4%

W pobranych na K2 EDTA próbkach osocza z badania AURA2 test **cobas** EGFR Test pozwolił na wykrycie mutacji w eksonach 18, 19, 20 i 21 genu EGFR, które wymieniono w Tabeli 39.

Tabela 39 Mutacje wykryte za pomocą testu cobas EGFR Test w kohorcie AURA2

Ekson	Sekwencja mutacji	Zmiana aminokwasu	Identyfikator COSMIC ¹⁴
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Nie stwierdzono
	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	Nie stwierdzono
	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	Nie stwierdzono
	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

Korelacja między próbkami osocza i tkanki w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M przy użyciu próbek z badania fazy II AURA2

Badanie kliniczne AURA2²³ było wieloośrodkowym, jednoramiennym badaniem fazy II prowadzonym metodą otwartej próby, oceniającym bezpieczeństwo i skuteczność produktu leczniczego TAGRISSO® (ozymertynib) jako leczenia drugiej lub ≥ trzeciej linii u pacjentów z zaawansowanym NSCLC, u których doszło do progresji choroby po wcześniejszej terapii dopuszczonym do stosowania TKI EGFR i u których stwierdzono występowanie mutacji T790M na podstawie testu **cobas** EGFR Test. Badaniu przesiewowemu poddano łącznie 472 pacjentów. W przypadku 383 pacjentów przeprowadzono badanie próbki osocza, a 371 pacjentów miało ważny wynik z próbki tkanki dla mutacji T790M w genie EGFR w teście **cobas** EGFR Test, spośród których u 233 pacjentów stwierdzono obecności mutacji T790M, a 210 poddano randomizacji w ramach badania.

Spośród 383 pacjentów kwalifikujących się do udziału w przypadku 344 dostępne były próbki osocza pobrane na K2 EDTA. W analizie uwzględniono łącznie 334 próbki ze sparowanymi wynikami w teście **cobas** EGFR Test zarówno z próbek tkanki, jak i osocza. Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA) między próbkami osocza i tkanek wynosiła 58,7% (95% CI: 52,2%, 65,0%), natomiast zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA) wynosiła 80,2% (95% CI: 71,8%, 86,5%) w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M. Wartość predykcyjna dodatnia (PPV) wynosiła 85,6% (95% CI: 79,2%, 90,3%), natomiast wartość predykcyjna ujemna (NPV) wynosiła 49,2% (95% CI: 42,0%, 56,4%) w odniesieniu do mutacji T790M, co przedstawiono w Tabeli 40.

Na wartość PPV przedstawioną w Tabeli 40 wpływ wywarły 22 próbki, które dały ujemny wynik na obecność mutacji T790M w tkance w teście **cobas** EGFR Test i wynik dodatni na obecność mutacji T790M w teście **cobas** EGFR Test w osoczu. W przypadku osiemnastu próbek potwierdzono obecność mutacji T790M na podstawie NGS w osoczu, a objętość jednej próbki nie była wystarczająca do przeprowadzenia badania NGS. Tylko w przypadku trzech nie stwierdzono mutacji T790M w badaniu metodą NGS.

Tabela 40 Zgodność między wynikami próbek osocza i tkanki w teście cobas EGFR w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M

Mutacja	Miara zgodności	Procent zgodności (N)	95% CI
T790M	Zgodność procentowa wyników dodatnich (PPA)	58,7% (131/223)	52,2%, 65,0%
	Zgodność procentowa wyników ujemnych (NPA)	80,2% (89/111)	71,8%, 86,5%
	Procentowa zgodność ogółem (OPA)	65,9% (220/334)	60,6%, 70,8%
	Dodatnia wartość predykcyjna (PPV)	85,6% (131/153)	79,2%, 90,3%
	Ujemna wartość predykcyjna (NPV)	49,2% (89/181)	42,0%, 56,4%

Uwaga: wartości PPA i NPA obliczono, wykorzystując tkankę jako punkt odniesienia.

Uwaga: wartości PPV i NPV obliczono, wykorzystując osocze jako punkt odniesienia.

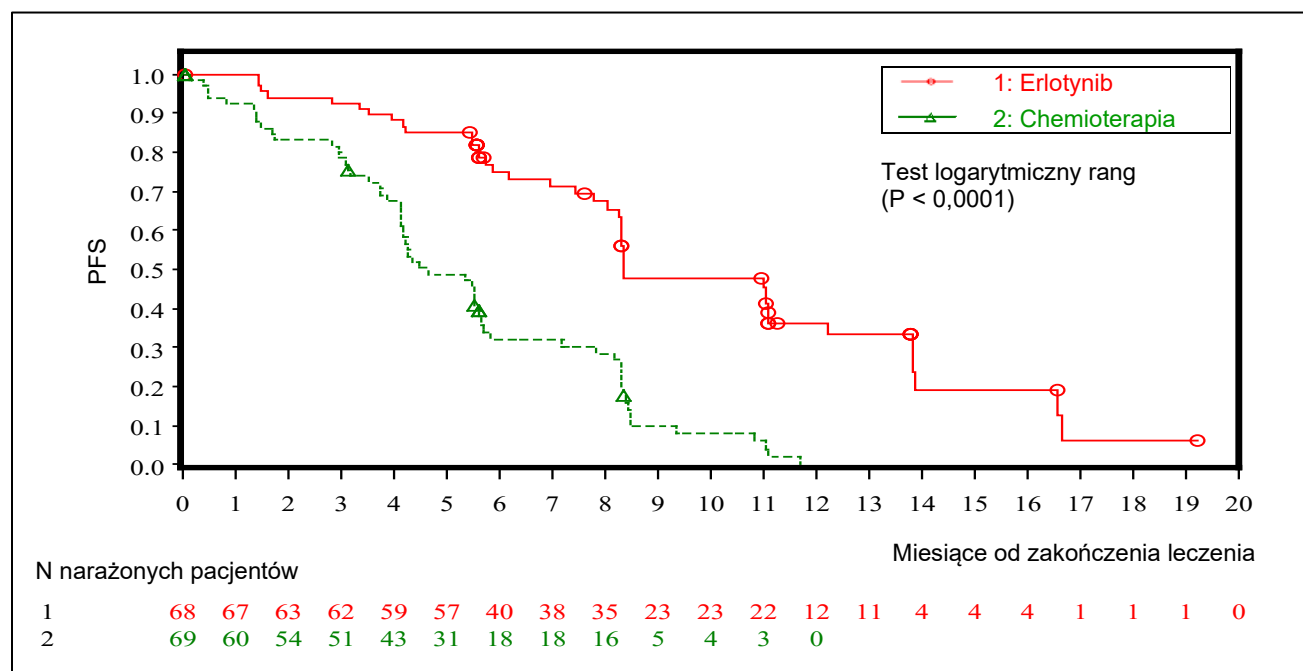
Zgodność między wynikami z próbek osocza i tkanek w odniesieniu do wykrywania mutacji T790M związanej z opornością na leczenie jest mniejsza niż w przypadku mutacji aktywujących. Na wartość PPA może wpływać niejednorodność tkanki: w odróżnieniu od mutacji aktywujących L858R i delecji w eksonie 19 mutacja T790M może występować w niewielkim odsetku komórek nowotworowych, gdyż zasadniczo jest mutacją nabytą. Dlatego cfDNA z mutacją T790M może występować jedynie w bardzo małym stężeniu w osoczu i poniżej poziomu wykrywalności. Na wartość NPA może również wpływać niejednorodność guza: ponieważ mutacja T790M może nie występować we wszystkich komórkach nowotworowych, biopsja tkanki może być pobrana z miejsca guza, w którym nie występuje mutacja T790M, chociaż w innym miejscu guza mutacja T790M może być obecna.⁷

Dane dotyczące wyniku klinicznego

ENSURE

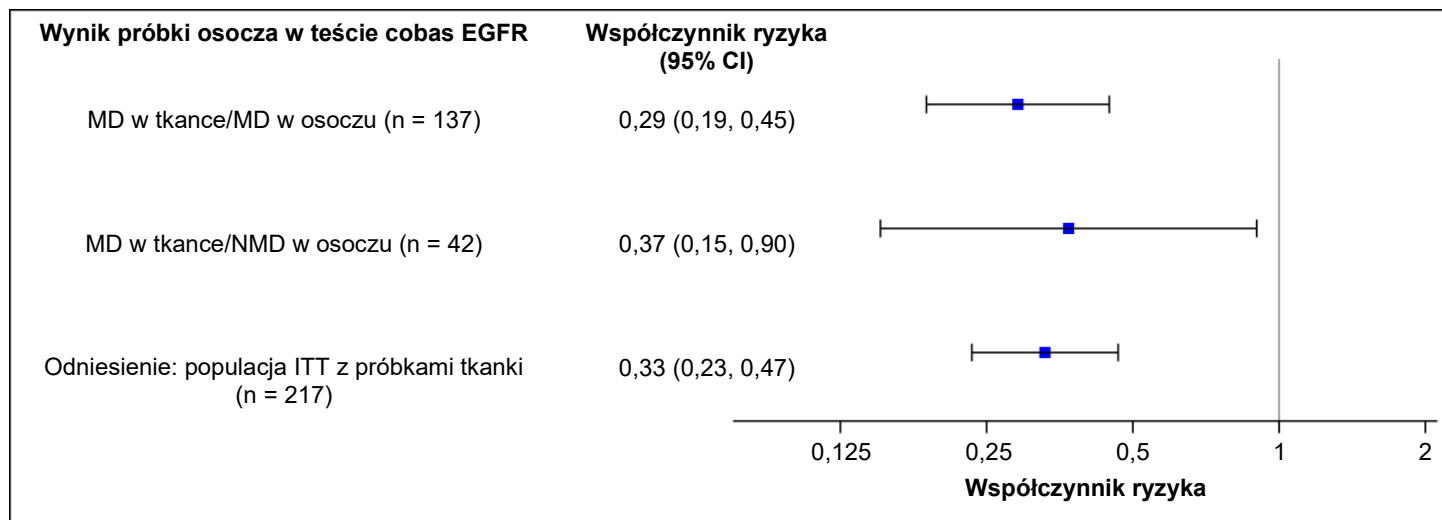
Spośród 217 pacjentów włączonych do udziału w badaniu ENSURE (tj. osób z wykrytą delecją w eksonie 19 lub mutacją L858R w próbce tkanki w teście **cobas** EGFR Test v1) dla 214 (98,6%) dostępne były próbki osocza pobrane na K2 EDTA, a w przypadku 180 osób objętość próbki osocza wynosiła 2,0 ml. Spośród 180 próbek osocza o objętości 2 ml przebadanych z użyciem testu **cobas** EGFR Test 137 dało wynik „Mutation Detected” dla delecji w eksonie 19 lub mutacji L858R (68 pacjentów w grupie leczonej erlotynibem, 69 pacjentów w grupie poddawanej chemioterapii), 42 dało wynik „No Mutation Detected” (22 pacjentów w grupie leczonej TARCEVA®, 20 pacjentów w grupie poddawanej chemioterapii), a jedna próbka wygenerowała wynik nieważny. Krzywe Kaplana-Meiera dla PFS w ocenie badacza w przypadku pacjentów z delecją w eksonie 19 lub mutacją L858R w próbkach osocza przedstawia Ryc. 15. W przypadku pacjentów z grupy leczonej produktem leczniczym TARCEVA® stwierdzono dłuższy PFS w porównaniu z pacjentami z grupy poddawanej chemioterapii, a dwie krzywe były dobrze oddzielone w okresie obserwacji (wartość $p < 0,001$), wskazując znaczne korzyści wynikające z leczenia produktem leczniczym TARCEVA® u pacjentów z wykrywalną w próbkach osocza mutacją aktywującą w genie EGFR.

Ryc. 15 Wykres Kaplana-Meiera dla PFS według metody leczenia w przypadku pacjentów z mutacją wykrytą w teście **cobas** EGFR Test zarówno w osoczu, jak i tkance (ocena badacza) (z próbkami osocza 2 ml)



Spójne korzyści w odniesieniu do PFS obserwowano u wszystkich pacjentów, u których stwierdzono mutację w genie EGFR w próbce tkanki i w przypadku których dostępne były próbki osocza o objętości 2,0 ml, niezależnie od stwierdzenia mutacji w próbce osocza, a korzyści te były zbliżone do korzyści w odniesieniu do PFS obserwowanych w ogólnej populacji ITT badania ENSURE (współczynnik ryzyka = 0,33; 95% CI: 0,23; 0,47), co przedstawia Ryc. 16 poniżej.

Ryc. 16 Wykres typu forest plot współczynników ryzyka dla PFS wg oceny badacza (z próbkami osocza 2 ml)



Uwaga: MD = wykryta mutacja (delecja w eksonie 19 lub mutacja L858R);
NMD = brak wykrytej mutacji (delecja w eksonie 19 i mutacja L858R)

AURA2

Zmienną pierwszorzędowego punktu końcowego w ocenie skuteczności był odsetek obiektywnych odpowiedzi (ang. *Objective Response Rate*, ORR) według kryteriów RECIST 1.1 przy użyciu możliwego do oceny zestawu do analizy odpowiedzi. ORR definiowano jako liczbę (%) pacjentów, którzy odbyli co najmniej jedną wizytę i u których stwierdzono odpowiedź całkowitą (ang. *Complete Response*, CR) lub częściową (ang. *Partial Response*, PR) potwierdzoną przynajmniej cztery tygodnie później (tj. najlepsza odpowiedź obiektywna [ang. *Best Objective Response*, BOR] spośród CR lub PR).

W zbiorze danych do analizy z populacji z próbkami tkanek z możliwością oceny odpowiedzi (ang. *Evaluable Response Analysis Set*, ERAS) (pacjenci ze stwierdzoną mutacją T790M w teście cobas EGFR Test w tkance, którzy otrzymali przynajmniej jedną dawkę produktu leczniczego TAGRISSO® i u których występowały mierzalne zmiany chorobowe w punkcie początkowym na podstawie BICR) u 111 pacjentów stwierdzono mutację T790M w pobranym na K2 EDTA osoczu w teście cobas EGFR Test (tj. T790M+ zarówno na podstawie próbek tkanki, jak i osocza). ORR dla tego podzbioru wyniósł 64,9% (72/111, 95% CI: 52,1%, 70,4%), co było bardzo zbliżoną wartością do ORR na poziomie 64,1% zaobserwowanego w populacji ERAS z próbkami tkanki.

W zbiorze danych do pełnej analizy (FAS) z populacji z próbkami tkanki (pacjenci ze stwierdzoną mutacją T790M w teście cobas EGFR Test w tkance, którzy otrzymali przynajmniej jedną dawkę produktu leczniczego TAGRISSO®) u 117 pacjentów stwierdzono mutację T790M w osoczu w teście cobas EGFR Test. ORR dla pacjentów z wynikiem T790M+ w próbkach tkanki i osocza wyniósł 61,5% (72/117, 95% CI: 55,2%, 73,7%), co było bardzo zbliżoną wartością do ORR na poziomie 61% zaobserwowanego w populacji FAS z próbkami tkanki. Wyniki tych analiz przedstawia Tabela 41. Ponieważ włączenie do udziału w badaniu AURA2 opierało się na dodatnich wynikach testu w próbkach tkanki, z tego badania nie były dostępne dane dotyczące wyników dla pacjentów z mutacją T790M stwierdzoną w osoczu i brakiem mutacji T790M w tkance.

Tabela 41 Odsetek obiektywnych odpowiedzi na podstawie wyniku w próbce osocza wśród pacjentów z mutacją T790M stwierdzoną w tkance włączonych do udziału w badaniu AURA2

Populacja (obecność mutacji T790M w próbce tkanki)	Wyniki testu cobas EGFR Test z próbki osocza	N	Liczba pacjentów z odpowiedzią (ORR) ^a n (%)	ORR (95% CI)
Zbiór danych do pełnej analizy z populacji z próbkami tkanki (FAS z próbkami tkanki)	T790M+ (FAS z próbkami osocza)	117	72 (61,5%)	(55,2%, 73,7%)
	T790M-	89	53 (59,6%)	(51,3%, 73,0%)
	Ogółem (FAS z próbkami tkanki)	210	128 (61,0%)	(57,0%, 70,8%)
Zbiór danych do analizy z populacji z próbkami tkanek z możliwością oceny odpowiedzi (ERAS z próbkami tkanki)	T790M+ (ERAS z próbkami osocza)	111	72 (64,9%)	(52,1%, 70,4%)
	T790M-	83	52 (62,7%)	(48,6%, 69,8%)
	Ogółem (ERAS z próbkami tkanki)	198	127 (64,1%)	(54,0%, 67,6%)

^a Odpowiedzi na leczenie obejmowały tylko potwierdzone odpowiedzi.

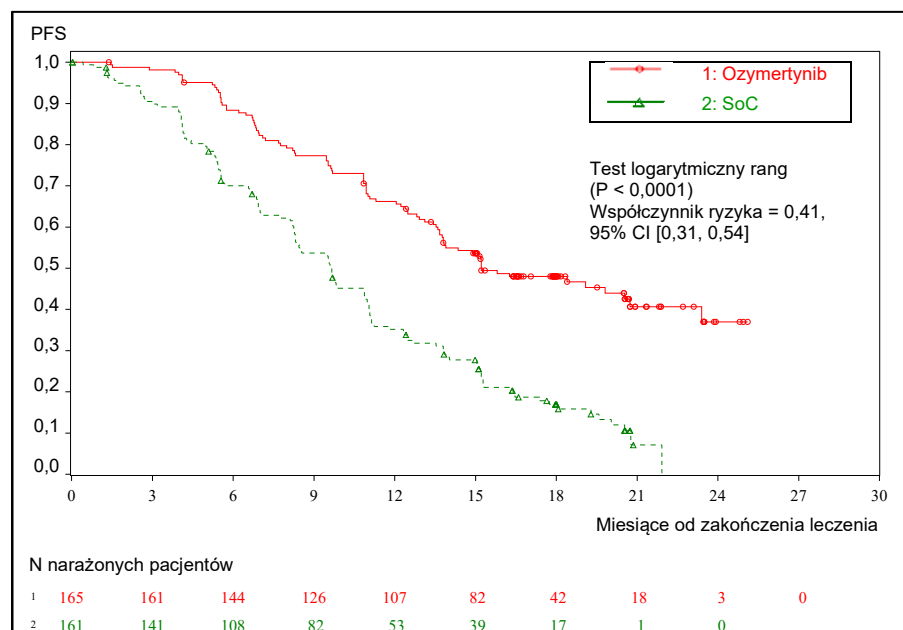
FLAURA

I. Badanie fazy III oceniające podawanie produktu leczniczego TAGRISSO® w ramach leczenia pierwszego rzutu

Łącznie 994 pacjentów przystąpiło do badań przesiewowych dla badania FLAURA.¹⁰ 556 pacjentów poddano randomizacji i włączono do badania klinicznego, natomiast 438 pacjentów nie przeszło badań przesiewowych. Z 556 pacjentów poddanych randomizacji do badania FLAURA, 537 zakwalifikowało się do analizy badania. Z 537 pacjentów kwalifikujących się do badania, 276 zostało poddanych randomizacji na podstawie wykonanego centralnie testu **cobas** EGFR z próbek tkanki, natomiast w przypadku 254 pacjentów dostępna do testów była próbka osocza pobranego na K2 EDTA — w 190 przypadkach uzyskano wynik dodatni testu **cobas** EGFR z próbki osocza (pEGFRm+); 261 pacjentów zostało poddanych randomizacji na podstawie testu wykonanego lokalnie, w której to grupie w przypadku 242 pacjentów dostępna do testów była próbka osocza — uzyskano 169 wyników dodatnich testu **cobas** EGFR z próbki osocza (136 przypadków stwierdzenia mutacji w genie EGFR w próbce tkanki przy użyciu testu **cobas** (tEGFRm+), 1 przypadek niestwierdzenia mutacji w genie EGFR w próbce tkanki przy użyciu testu **cobas** (tEGFRm-) i 32 wyniki nieważne/pacjenci nieprzetestowani przy użyciu testu **cobas** z próbki tkanki).

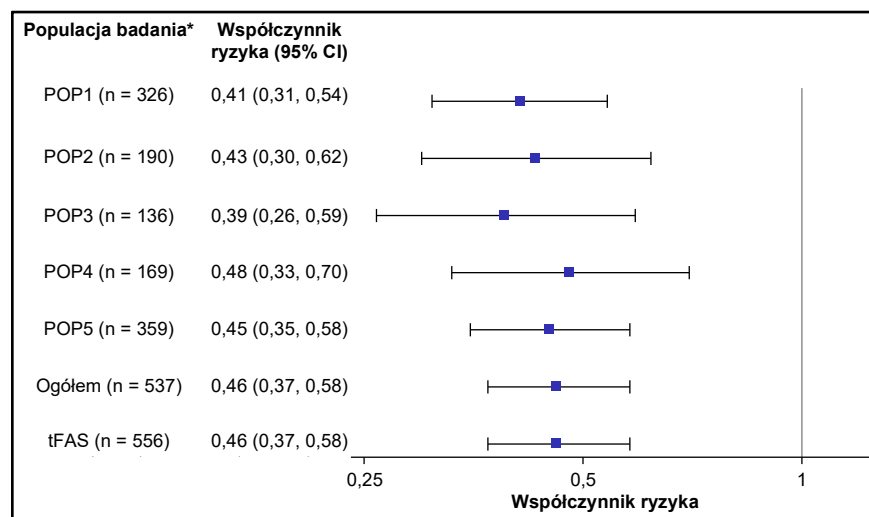
W przypadku populacji głównej próbek osocza (tEGFRm+ oraz pEGFRm+ w teście **cobas** EGFR, N = 326, 190 pacjentów randomizowanych centralnie i 136 randomizowanych lokalnie) HR wynosił 0,41 (95% CI: 0,31, 0,54) a współczynnik HR dla FAS badania FLAURA (tEGFRm+, N = 556) wynosił 0,46 (95% CI: 0,37, 0,58). W związku z tym skuteczność leku w populacji głównej próbek osocza jest zgodna z wynikami dla populacji FAS badania FLAURA. Wykres Kaplana-Meiera dla populacji głównej próbek osocza z delecją w eksonie 19 lub mutacją L858R w próbce osocza przedstawia również Ryc. 17.

Ryc. 17 Wykres Kaplana-Meiera okresu PFS wg sposobu leczenia dla populacji głównej próbek osocza badania FLAURA (pacjenci z wynikiem tEGFRm+ i cobas pEGFRm+ w teście cobas, n = 326)



Wyższość leczenia produktem leczniczym TAGRISSO® w porównaniu do standardowego leczenia była spójna w obrębie wszystkich podgrup z dodatnim wynikiem testu w próbce osocza i była definiowana statusem kwalifikacji tEGFR w teście **cobas** wykonywanym lokalnie i centralnie, z HR w przedziale od 0,39 do 0,48, co było zgodne z wskaźnikiem HR uzyskanym dla populacji FAS w badaniu FLAURA (HR = 0,46) co przedstawia Ryc. 18 poniżej.

Ryc. 18 Wykres typu Forest Plot dla wskaźników HR dla podgrup badania FLAURA zdefiniowanych statusem testu cobas EGFR wykonywanym lokalnie i centralnie



POP = populacja (podgrupa).

* POP1: wszyscy pacjenci poddani randomizacji z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce tkanki i testu **cobas** w próbce osocza.

POP2: pacjenci poddani randomizacji przy użyciu testu **cobas** w próbce tkanki oraz z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza.

POP3: pacjenci poddani randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbce tkanki oraz z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza i tkanki.

POP4: pacjenci poddani randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbce tkanki oraz z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza.

POP5: wszyscy pacjenci poddani randomizacji z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza.

Ogółem: wszyscy pacjenci poddani randomizacji z wyłączeniem 19 pacjentów z Chin.

tFAS: wszyscy pacjenci poddani randomizacji (zbiór danych do pełnej analizy badania FLAURA).

II. Analiza standardowego leczenia produktem leczniczym IRESSA®

Przeprowadzono oddzielną analizę pacjentów z grupy standardowego leczenia leczonych produktem leczniczym IRESSA® (gefitynib). Ze wszystkich pacjentów leczonych w badaniu FLAURA produktem leczniczym IRESSA® z odpowiedzią obiektywną w ocenie badacza, u 105 pacjentów uzyskano wynik dodatni testu **cobas** w próbce osocza pobranego na K2 EDTA. ORR dla wszystkich pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza wyniósł 71,4% (75/105, 95% CI: 62,2%, 79,2%, POP4 w Tabela 42).

Ze 105 z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza, 47 pacjentów poddano randomizacji według testu **cobas** w próbce tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności dla testu **cobas** w próbce osocza) a 58 pacjentów poddano randomizacji według testu wykonanego lokalnie. Łącznie 36 pacjentów w populacji analizy pierwszorzędowej skuteczności uznano, w ocenie badacza, za wykazujących odpowiedź dla testu **cobas** w próbce osocza (n = 47), co pozwoliło uzyskać ORR o wartości 76,6% (95% CI: 62,8%, 86,4%, POP1 w Tabela 42).

ORR wyniósł 62,2% (28/45, 95% CI: 47,6%, 74,9%) w przypadku pacjentów zrandomizowanych lokalnie, z dodatnim wynikiem w teście **cobas** w próbce tkanki i teście **cobas** w próbce osocza (POP2 w Tabela 42). ORR wyniósł 69,6% (64/92, 95% CI: 59,5%, 78,0%) w przypadku wszystkich pacjentów leczonych produktem leczniczym IRESSA® z dodatnim wynikiem w teście **cobas** w próbce tkanki i teście **cobas** w próbce osocza (POP3 w Tabela 42). Wykres typu Forest Plot współczynników dla innych populacji pacjentów przedstawiono na Ryc. 19. Wyniki wskazują, że efekt terapeutyczny produktu leczniczego IRESSA®, na podstawie testu **cobas** w próbkach osocza utrzymywał się w każdej subpopulacji. Te wyniki są zgodne z wynikami zgłoszonymi dla oryginalnego badania rejestracyjnego (IFUM) dla pacjentów wybranych do stosowania produktu leczniczego IRESSA®.¹³

Tabela 42 Współczynniki ORRs dla pacjentów z dodatnim wynikiem testu cobas w próbce osocza i leczonych produktem leczniczym IRESSA® w ramach badania FLAURA

Odpowiedź obiektywna	Pacjenci z dodatnim wynikiem w próbce osocza (pEGFR+) w grupie SoC leczenia produktem leczniczym IRESSA®				
	pEGFR+ Randomizacja centralna (cobas tEGFR+)	pEGFR+ Randomizacja lokalna (lokalnie wykonany test tEGFR+)			Ogółem
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Nieważny/ Nieprzetestowano	
Liczba pacjentów	47	45	1	12	105
Odpowiedź	36	28	1	10	75
Brak odpowiedzi	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%)		-	-	-

Uwaga: tEGFR = EGFR w próbce tkanki; pEGFR = EGFR w próbce osocza; CI = przedział ufności.

POP = populacja (podgrupa).

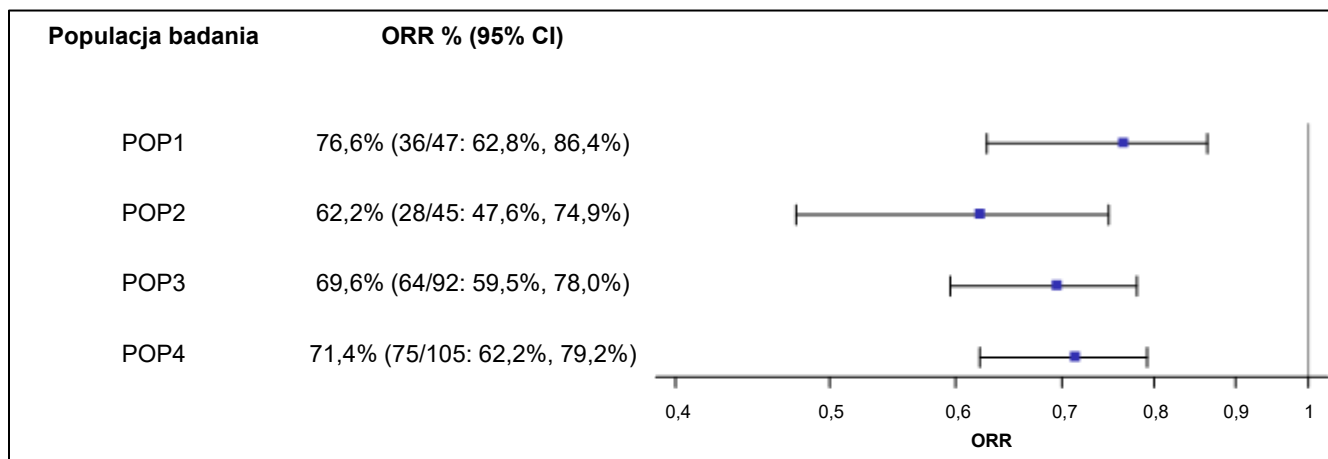
POP1: ORR dla pacjentów **cobas** pEGFR+ poddanych randomizacji przy użyciu testu **cobas** w próbkach tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności dla testu **cobas** w próbkach osocza).

POP2: ORR dla pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza i tkanki poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki.

POP3: ORR dla wszystkich pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza i tkanki.

POP4: ORR dla wszystkich pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza.

Ryc. 19 Wykresy typu Forest Plot współczynników ORR na podstawie testu cobas EGFR w próbkach osocza dla różnych populacji



POP = populacja (podgrupa).

POP1: ORR dla pacjentów **cobas** pEGFR+ poddanych randomizacji przy użyciu testu **cobas** w próbkach tkanki (populacja analizy pierwszorzędowej skuteczności dla testu **cobas** w próbkach osocza).

POP2: ORR dla pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza i tkanki poddanych randomizacji przy użyciu wykonywanego lokalnie testu w próbkach tkanki.

POP3: ORR dla wszystkich pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza i tkanki.

POP4: ORR dla wszystkich pacjentów z dodatnim wynikiem testu **cobas** w próbce osocza.

Flagi wyników

Objaśnienie flag wyników

Źródło flagi jest podane w kodzie flagi, co wskazuje Tabela 43.

Tabela 43 Źródło flagi

Kod flagi zaczyna się od	Źródło flagi	Przykład
M ^a	Wiele lub inne powody	M6
R	Interpretacja wyników	R20
Z ^a	Analizator	Z1

^a Patrz instrukcja obsługi systemu **cobas® 4800 System** lub podręcznik użytkownika **cobas® 4800 System**

Tabela 44 zawiera listę wszystkich flag wyników systemu, które dotyczą użytkownika.

Tabela 44 Lista flag interpretacji wyników

Kod flagi	Natężenie	Opis	Zalecane działanie
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Błąd	Nie wykryto żadnego celu	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują wystąpienie negatywnego wyniku dla próbki (tj. mogło nie dojść do dodania próbki do co najmniej jednej studzienki).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Błąd	Nie wykryto kontroli mutacji	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że algorytm określania piku napotkał błąd, który może wystąpić w razie atypowego lub wysyczonego szumami obrazu fluorescencji.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Błąd	Nie wykryto kontroli mutacji	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują wystąpienie negatywnego wyniku dla kontroli mutacji. Mogło nie dojść do dodania DNA kontroli mutacji do co najmniej jednej studzienki).
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Błąd	Kontrola mutacji jest poza zakresem	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że zaobserwowana wartość Ct dla kontroli mutacji wykraczała poza ustaloną wartość graniczną (tj. za wysoki pik). Możliwe powody: 1. Nieprawidłowe przygotowanie roboczego odczynnika Master Mix (Mieszanina główna). 2. Błąd pipetowania podczas dodawania odczynnika roboczego Master Mix do studzienki płytki z mikrostudzienkami. 3. Błąd pipetowania podczas dodawania kontroli mutacji do studzienki płytki z mikrodołkami.
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Błąd	Kontrola mutacji jest poza zakresem	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że zaobserwowana wartość Ct dla kontroli mutacji była mniejsza od ustalonej wartości granicznej (tj. za niski pik). Taki błąd może występować w razie kontaminacji DNA.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Błąd	Nie wykryto kontroli ujemnej	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że algorytm określania piku napotkał błąd, który może wystąpić w razie atypowego lub wysyczonego szumami obrazu fluorescencji.
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Błąd	Wartość kontroli ujemnej jest poza zakresem	Powtórz przebieg testowy. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują wystąpienie dodatniego wyniku dla kontroli ujemnej (co oznacza kontaminację).

Kod flagi	Natężenie	Opis	Zalecane działanie
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Błąd	Nie wykryto żadnego celu	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że algorytm określania piku napotkał błąd, który może wystąpić w razie atypowego lub wysyczonego szumami obrazu fluorescencji.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Błąd	Wynik poza zakresem	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują odnotowanie nietypowo niskiej wartości Ct dla próbki.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Błąd	Wynik poza zakresem	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują odnotowanie dla próbki nietypowej zależności pomiędzy wartością Ct mutacji i wartością Ct kontroli wewnętrznej.
R811, R831, R851	Błąd	Nie wykryto kontroli wewnętrznej	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że algorytm określania piku napotkał błąd, który może wystąpić w razie atypowego lub wysyczonego szumami obrazu fluorescencji.
R812, R832, R852	Błąd	Nie wykryto kontroli wewnętrznej	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że wynik kontroli wewnętrznej dla próbki był nieważny. Brak ważnego wyniku kontroli wewnętrznej może sugerować: 1. Niską jakość genomowego DNA w próbce 2. Nieodpowiednie przetworzenie próbki 3. Obecność inhibitorów PCR w próbce 4. Występowanie rzadkich mutacji mutacje w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się primery i/lub sondy kontroli wewnętrznej 5. Mogło nie dojść do dodania DNA próbki do co najmniej jednej studzienki 6. Występowanie innych czynników
R813, R834, R853	Błąd	Wynik kontroli wewnętrznej poza zakresem	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują, że wynik kontroli wewnętrznej dla próbki był nieważny. Brak ważnego wyniku kontroli wewnętrznej może sugerować: 1. Niską jakość genomowego DNA w próbce 2. Nieodpowiednie przetworzenie próbki 3. Obecność inhibitorów PCR w próbce 4. Występowanie rzadkich mutacji mutacje w obrębie regionów genomowego DNA, z którymi wiążą się primery i/lub sondy kontroli wewnętrznej 5. Mogło nie dojść do dodania DNA próbki do co najmniej jednej studzienki 6. Występowanie innych czynników
R814, R835, R854	Błąd	Wynik kontroli wewnętrznej poza zakresem	Powtórzyć oznaczenie próbki. Patrz sekcja Procedura testu . Te kody flag wskazują odnotowanie nietypowo niskiej wartości Ct kontroli wewnętrznej dla próbki. Taki błąd może występować w razie przeładowania mieszaniny PCR stężonym genomowym DNA.

Dodatkowe informacje

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 45 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

Age/DOB Wiek lub data urodzenia	 Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie	QS IU/PCR IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek między-narodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
 Oprogramowanie pomocnicze	 Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania	SN Numer seryjny
Assigned Range [copies/mL] Przypisany zakres (kopie/ml)	 Dystrybutor (Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)	Site Ośrodek
Assigned Range [IU/mL] Przypisany zakres (IU/ml)	 Nie używać повторно	Procedure Standard Procedura standardowa
EC REP Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej	 Kobieta	STERILE EO Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu
BARCODE Arkusz kodów kreskowych	 Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD	 Przechowywać z dala od światła
LOT Kod partii	GTIN Numer globalny jednostki handlowej	 Przestrzegać zakresu temperatury
 Zagrożenie biologiczne	 Importer	 Plik definicji testów
REF Numer katalogowy	IVD Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>	 Tą stroną do góry
 Oznaczenie zgodności CE – wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>	LLR Dolna granica przypisanego zakresu	Procedure UltraSensitive Procedura ultraczuła
Collect Date Data pobrania	 Mężczyzna	UDI Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu
 Sprawdź w instrukcji użytkowania	 Wytwórca	ULR Górna granica przypisanego zakresu
 Zawartość wystarczająca na <n> testów	CONTROL - Kontrola ujemna	Urine Fill Line Linia napełniania moczem
CONTENT Zawartość zestawu	 Wyrób niejałowy	Rx Only Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
CONTROL Próba kontrolna	 Nazwisko pacjenta	 Termin przydatności
 Data produkcji	 Numer pacjenta	
 Wyrób do testów przy pacjencie	 Rozerwać tutaj	
 Wyrób do samodzielnego testowania	CONTROL + Kontrola dodatnia	
	QS copies / PCR Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.	

Pomoc techniczna

W celu uzyskania wsparcia (pomocy) technicznego należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem:

https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Wytwórca

Tabela 46 Wytwórca

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



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

Made in USA

Znaki towarowe i patenty

COBAS, COBAS Z i AMPERASE są znakami towarowymi firmy Roche.

Inne nazwy produktów i znaki towarowe są własnością odpowiednich podmiotów.

Technologia zapobiegania zanieczyszczeniu preparatu enzymu AmpErase resztkami jest chroniona patentem USA nr 7,687,247 stanowiącym własność firmy Life Technologies; udostępniono ją na zasadzie licencji firmie Roche Molecular Systems, Inc.

Pewne sekwencje genu EGFR zawarte w tym produkcie są chronione przez co najmniej jeden patent firmy Genzyme Corp. i Dana Farber Cancer Institute oraz The General Hospital Corporation i udostępnionych na licencji firmie Roche Molecular Systems, Inc. pod numerem patentu nr 7,964,349 oraz jako inne patenty amerykańskie i zagraniczne oczekujące na zatwierdzenie.

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

Prawo autorskie

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

Piśmiennictwo

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

16. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009:21-1112.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA;CLSI, 2014.
18. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
19. Costa D. B., Nguyen K. S., Cho B. C., Sequist L. V., Jackman D. M., Riely G. J., et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(21):7060-7.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D:Wayne, PA; CLSI, 2005.
22. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2012;13(3):239-46.
23. Goss G., Tsai C. M., Shepherd F. A., Bazhenova L., Lee J. S., Chang G. C., et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. The Lancet Oncology. 2016;17(12):1643-52.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved Guideline. CLSI Document EP-06A: Wayne, PA; CLSI, Apr 2003.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 7.0 03/2022	Zaktualizowano instrukcje dotyczące przechowywania krwi pełnej dla Pobierania próbek i pracy z próbkami dla probówki do pobierania DNA pozakomórkowego w Części B. Zaktualizowano do aktualnych podmiotów gospodarczych. Dodano/zaktualizowano część Pomoc techniczna. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. Dodano deklarację „Made in”. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.