

cobas[®]



Rx Only

cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*



cobas[®] EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

Για δείγματα FFPET, ανατρέξτε στο κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas[®]** (M/N 05985536190) για την προετοιμασία δειγμάτων.

Για δείγματα πλάσματος, ανατρέξτε στο κιτ προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas[®]** (M/N 07247737190) για την προετοιμασία δειγμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Προβλεπόμενη χρήση	6
Σύνοψη και επεξήγηση της εξέτασης.....	7
Επιστημονικό υπόβαθρο	7
Βασικές αρχές της διαδικασίας.....	9
Προετοιμασία δειγμάτων	9
Ενίσχυση PCR	9
ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΟΥ	11
Υλικά και αντιδραστήρια	11
Παρεχόμενα υλικά και αντιδραστήρια.....	11
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	12
Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά.....	13
Όργανα και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	13
Προφυλάξεις και απαιτήσεις χειρισμού.....	14
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	14
Ορθή εργαστηριακή πρακτική	14
Επιμόλυνση.....	14
Ορθή χρήση	15
Απόρριψη.....	15
Διαρροή υγρών και καθαρισμός	15
Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη των δειγμάτων	16
Συλλογή δειγμάτων.....	16
Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων.....	16
Φύλαξη και σταθερότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων	16
Διαδικασία εξέτασης	17
Εκτέλεση της εξέτασης.....	17
Οδηγίες χρήσης.....	17
Αριθμός αναλύσεων.....	17
Ορός ελέγχου πλήρους επεξεργασίας	17
Απομόνωση DNA	18
Μακροεκτομή	18
Ποσοτικοποίηση DNA.....	18
Ενίσχυση και ανίχνευση	19
Ρύθμιση του οργάνου.....	19
Ρύθμιση εντολής εξέτασης.....	19
Υπολογισμός αραίωσης του αρχικού δείγματος DNA.....	20
Αραίωση δείγματος.....	21

Προετοιμασία αντίδρασης	21
Έναρξη διαδικασίας PCR	23
Αποτελέσματα	24
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	24
Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα	24
Ποιοτικός έλεγχος και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων	25
Ορός ελέγχου μετάλλαξης	25
Αρνητικός ορός ελέγχου	25
Περιορισμοί της διαδικασίας	25
Αξιολόγηση απόδοσης μη κλινικών δειγμάτων	26
Αναλυτική ευαισθησία — όριο τυφλού	26
Όριο ανίχνευσης με χρήση των μιγμάτων δειγμάτων FFPET	27
Ελάχιστη περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό	29
Διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες μεταλλάξεις των εξονίων 18, 19, 20 και 21	30
Δείγματα της κλινικής δοκιμής EURTAC	30
Δείγματα της κλινικής δοκιμής AURA2	30
Ειδικότητα — Μικροοργανισμοί και ομόλογα EGFR	30
Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τους πνεύμονες	30
Πλασμίδια ομολόγων EGFR	30
Αλληλεπίδραση	31
Νεκρωτικός ιστός	31
Επαναληψιμότητα	31
Επαναληψιμότητα του χειρισμού δειγμάτων	31
Αξιολόγηση της κλινικής απόδοσης	32
Κλινική μελέτη επαναληψιμότητας 1	32
Κλινική μελέτη επαναληψιμότητας 2	33
Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης III από τη δοκιμή EURTAC	34
Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2	37
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων	38
EURTAC	38
AURA2	39
FLAURA	40

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	45
Προετοιμασία δειγμάτων.....	45
Υλικά και αντιδραστήρια	45
Παρεχόμενα υλικά και αντιδραστήρια.....	45
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	46
Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά.....	47
Όργανα και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	47
Προφυλάξεις και απαιτήσεις χειρισμού.....	48
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	48
Ορθή εργαστηριακή πρακτική	48
Επιμόλυνση.....	48
Ορθή χρήση	49
Απόρριψη.....	49
Διαρροή υγρών και καθαρισμός	49
Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη των δειγμάτων	49
Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων	50
Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων.....	50
Φύλαξη και σταθερότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων	50
Διαδικασία εξέτασης.....	51
Εκτέλεση της εξέτασης.....	51
Οδηγίες χρήσης.....	51
Αριθμός αναλύσεων.....	51
Ορός ελέγχου πλήρους επεξεργασίας	51
Απομόνωση DNA	51
Ενίσχυση και ανίχνευση	52
Ρύθμιση του οργάνου.....	52
Ρύθμιση εντολής εξέτασης.....	52
Προετοιμασία αντίδρασης	53
Έναρξη διαδικασίας PCR	55
Αποτελέσματα	55
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων.....	55
Ημι-ποσοτικός δείκτης (SQI).....	56
Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα	56
Ποιοτικός έλεγχος και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.....	56
Ορός ελέγχου μετάλλαξης	56
Αρνητικός ορός ελέγχου	56
Περιορισμοί της διαδικασίας	56

Αξιολόγηση απόδοσης μη κλινικών δειγμάτων	58
Αναλυτική απόδοση	58
Αναλυτική ευαισθησία — όριο τυφλού	58
Όριο ανίχνευσης με τη χρήση DNA κυτταρικής σειράς	58
Διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες μεταλλάξεις των εξονίων 18, 19, 20 και 21	59
Δείγματα από την επέκταση της κλινικής δοκιμής AURA και την κλινική δοκιμή AURA2	59
Ειδικότητα — μικροοργανισμός	59
Αλληλεπίδραση	59
Γραμμικότητα	60
Επαναληψιμότητα	63
Αξιολόγηση της κλινικής απόδοσης	64
Κλινική αναπαραγωγιμότητα με πλάσμα σε K2 EDTA	64
Κλινική αναπαραγωγιμότητα με πλάσμα σε Roche cfDNA	65
Όριο ανίχνευσης (LoD) με χρήση δειγμάτων πλάσματος από ασθενείς με NSCLC	67
Συσχέτιση πλάσματος σε Roche cfDNA με πλάσμα σε K2 EDTA	67
Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων πλάσματος φάσης III από τη δοκιμή ASPIRATION	69
Συσχετισμός μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και ιστού με χρήση του cobas EGFR Test για την ανίχνευση των μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R σε δείγματα φάσης III από τη δοκιμή ENSURE	69
Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2	71
Συσχετισμός μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και ιστού για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2	72
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων	73
ENSURE	73
AURA2	75
FLAURA	75
Ενδείξεις αποτελεσμάτων	79
Εξήγηση ενδείξεων αποτελεσμάτων	79
Πρόσθετες πληροφορίες	82
Σύμβολα	82
Τεχνική υποστήριξη	83
Κατασκευαστής	83
Εμπορικά σήματα και διπλώματα ευρεσιτεχνίας	83
Copyright	83
Βιβλιογραφία	84
Αναθεώρηση εγγράφου	86

Προβλεπόμενη χρήση

Το **cobas®** EGFR Mutation Test v2 είναι μια εξέταση PCR πραγματικού χρόνου για την ποιοτική ανίχνευση καθορισμένων μεταλλάξεων του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Για την ανίχνευση των καθορισμένων μεταλλάξεων του EGFR χρησιμοποιείται DNA που έχει απομονωθεί από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPET) ή ελεύθερο κυκλοφορούν νεοπλασματικό DNA (cfDNA) από πλάσμα προερχόμενο από περιφερικό ολικό αίμα με αντιπηκτικό EDTA.

Η εξέταση ενδείκνυται ως συνοδευτικό διαγνωστικό μέσο, το οποίο συμβάλλει στην επιλογή των ασθενών με NSCLC που είναι κατάλληλοι για θεραπεία με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης που στοχεύουν τον EGFR (συμπεριλαμβανομένων των στοχευμένων θεραπειών που αναφέρει ο Πίνακας 1 παρακάτω), σύμφωνα με την εγκεκριμένη επισήμανση των θεραπευτικών προϊόντων:

Πίνακας 1

Φάρμακο	FFPET	Πλάσμα
TARCEVA® (ερλοτινίμπη)	Ελλείψεις στο εξώνιο 19 και L858R	Ελλείψεις στο εξώνιο 19 και L858R
TAGRISSO® (οσιμερτινίμπη)	Ελλείψεις στο εξώνιο 19, L858R και T790M	Ελλείψεις στο εξώνιο 19, L858R και T790M
IRESSA® (γεφτινίμπη)	Ελλείψεις στο εξώνιο 19 και L858R	Ελλείψεις στο εξώνιο 19 και L858R

Η εξέταση δειγμάτων πλάσματος είναι η πλέον κατάλληλη για ασθενείς στους οποίους δεν είναι δυνατή η λήψη βιοψίας όγκου. Οι ασθενείς που είναι αρνητικοί για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις βάσει αυτής της εξέτασης δειγμάτων πλάσματος θα πρέπει να υποβάλλονται αντανάκλαστικά σε βιοψία ιστού ρουτίνας και σε εξέταση για μεταλλάξεις του EGFR με χρήση του τύπου δείγματος FFPET, εάν είναι διαθέσιμο.

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου δεν έχουν τεκμηριωθεί για τις ακόλουθες μεταλλάξεις του EGFR που έχουν επίσης ανιχνευθεί μέσω του **cobas®** EGFR Mutation Test v2:

Πίνακας 2

Φάρμακο	FFPET	Πλάσμα
TARCEVA® (ερλοτινίμπη)	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, T790M, S768I και L861Q	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, T790M, S768I και L861Q
TAGRISSO® (οσιμερτινίμπη)	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, S768I και L861Q	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, S768I και L861Q
IRESSA® (γεφτινίμπη)	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, T790M, S768I και L861Q	G719X, ενθέσεις στο εξώνιο 20, T790M, S768I και L861Q

Το **cobas®** EGFR Mutation Test v2 για χρήση με πλάσμα περιλαμβάνει μια ημιποσοτική μέτρηση των μεταλλάξεων στα εξώνια 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου EGFR. Αυτή η μέτρηση, που αναφέρεται ως ημιποσοτικός δείκτης (SQI), συσχετίζεται με την ποσότητα μεταλλαγμένου cfDNA στόχου στο πλάσμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αλλαγών στο φορτίο του μεταλλαγμένου cfDNA στόχου ενός δεδομένου ασθενούς με την πάροδο του χρόνου.

Για χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων, τα δείγματα FFPET υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas®** και τα δείγματα πλάσματος υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®**. Για αυτόματη ενίσχυση και ανίχνευση, χρησιμοποιείται ο αναλυτής **cobas® z 480**.

Σύνοψη και επεξήγηση της εξέτασης

Επιστημονικό υπόβαθρο

Οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του EGFR προκύπτουν κυρίως σε NSCLC και οδηγούν σε συστατική ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης της πρωτεΐνης EGFR, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ογκογόνο διαδικασία.¹ Η επικράτηση των μεταλλάξεων αυτών σε μη επιλεγμένα περιστατικά NSCLC είναι περίπου 10–30%.^{2,3} Ωστόσο, οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται συχνότερα, αλλά όχι αποκλειστικά, σε γυναίκες ασθενείς ασιατικής καταγωγής που δεν καπνίζουν/καπνίζουν λίγο και πάσχουν από ιστολογικούς τύπους αδενοκαρκινώματος.⁴

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του EGFR σε ασθενείς με NSCLC περιλαμβάνουν μια ποικιλία ελλείψεων στο εξόνιο 19 και τη μετάλλαξη αντικατάστασης L858R στο εξόνιο 21. Οι μεταλλάξεις αυτές συγκεντρωτικά αποτελούν περίπου το 85% των μεταλλάξεων του EGFR που παρατηρούνται στον NSCLC.⁵ Το **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (**cobas** EGFR Test) είναι μια ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου, σχεδιασμένη για την ανίχνευση της παρουσίας μεταλλάξεων αντικατάστασης G719X στο εξόνιο 18, μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19, μεταλλάξεων αντικατάστασης T790M και S768I στο εξόνιο 20, μεταλλάξεων ένθεσης στο εξόνιο 20 και μεταλλάξεων αντικατάστασης L858R και L861Q στο εξόνιο 21.

Το **cobas** EGFR Test χρησιμοποιείται ως συνοδευτική διαγνωστική εξέταση για το TARCEVA® (ερλοτινίμη), μια ουσία που αναστέλλει αναστρέψιμα τη δράση κινάσης του EGFR, εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης που σχετίζονται με τον υποδοχέα και αναστέλλοντας έτσι την περαιτέρω αντινεοπλασματική σηματοδότηση που προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η δεσμευτική συγγένεια του TARCEVA® για τον EGFR με μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 ή με L858R στο εξόνιο 21 είναι υψηλότερη από τη συγγένειά του για τον υποδοχέα άγριου τύπου (wild-type).⁶ Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με προχωρημένο NSCLC και με μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 ή με μεταλλάξεις αντικατάστασης L858R στο εξόνιο 21, οι οποίοι λαμβάνουν TARCEVA® ως θεραπεία πρώτης γραμμής, είναι πιθανό να εμφανίσουν κλινικό όφελος, σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία.^{3,7}

Το **cobas** EGFR Test χρησιμοποιείται ως συνοδευτική διαγνωστική εξέταση για το TAGRISSO® (οσιμερτινίμη), έναν μη αναστρέψιμο αναστολέα του EGFR που φέρει μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης στους TKI και μεταλλάξεις ανθεκτικότητας T790M για ασθενείς με προχωρημένο NSCLC. Το TAGRISSO® αναστέλλει τη δράση κινάσης του EGFR, με αποτέλεσμα την αναστολή μιας αλληλουχίας ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών συμβάντων που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση.⁸ Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με προχωρημένο μη πλακώδες NSCLC με μετάλλαξη ευαισθητοποίησης του EGFR TKI, οι οποίοι έχουν εμφανίσει εξέλιξη της νόσου μετά από θεραπεία με έναν EGFR TKI πρώτης γενιάς και έχουν αναπτύξει μετάλλαξη T790M στο εξόνιο 20, η οποία παρέχει ανθεκτικότητα στους TKI, όταν λαμβάνουν θεραπεία με TAGRISSO® είναι πιθανό να εμφανίσουν κλινικό όφελος.⁹ Μια κλινική μελέτη φάσης III έδειξε ότι ασθενείς με προχωρημένο NSCLC (θετικό για μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19 ή μετάλλαξη αντικατάστασης L858R στο εξόνιο 21) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με TAGRISSO® ως θεραπεία πρώτης γραμμής εμφάνισαν μεγαλύτερο κλινικό όφελος σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με παράγοντα EGFR TKI πρώτης γενιάς (γεφτινίμη ή ερλοτινίμη).¹⁰

Το **cobas** EGFR Test χρησιμοποιείται ως συνοδευτική διαγνωστική εξέταση για το IRESSA® (γεφτινίμη), μια ουσία που αναστέλλει αναστρέψιμα τη δράση κινάσης του EGFR, εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης που σχετίζονται με τον υποδοχέα και αναστέλλοντας έτσι την περαιτέρω αντινεοπλασματική σηματοδότηση που προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με προχωρημένο NSCLC και με μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 ή με μεταλλάξεις αντικατάστασης L858R στο εξόνιο 21, οι οποίοι λαμβάνουν IRESSA® ως θεραπεία πρώτης γραμμής, είναι πιθανό να εμφανίσουν κλινικό όφελος, σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία.^{11, 12 13}

Ο Πίνακας 3 παραθέτει τις μεταλλάξεις EGFR που ανιχνεύονται από το **cobas** EGFR Test.

Πίνακας 3 Το cobas EGFR Test έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση των παρακάτω μεταλλάξεων

Εξώνιο	Ομάδα Μεταλλάξεων EGFR	Αλληλουχία Νουκλεϊκού Οξέως EGFR	Ονοματολογία πρωτεϊνών κατά HGVS*	Ονοματολογία νουκλεοτιδίων κατά HGVS*	COSMIC ID ¹⁴
Εξώνιο 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
Εξώνιο 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
Εξώνιο 20	S768I	2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)	LRG_304t1:c.2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)	LRG_304t1:c.2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9 GCCAGCGTG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG	12376
		2319_2320insCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	12377
		2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9 GCGTGGACA	LRG_304p1:p.(Ser768_Asp770dup)	LRG_304t1:c.2303_2311dupGCGTGGACA	13428
		2309_2310AC> CCAGCGTGGAT	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT	13558
Εξώνιο 21	L858R	2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT	12429
	L861Q	2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)	LRG_304t1:c.2582T>A	6213

* HGVS — Human Genome Variation Society (Εταιρεία ποικιλότητας του ανθρώπινου γονιδιώματος)

Βασικές αρχές της διαδικασίας

Το **cobas** EGFR Test βασίζεται σε δύο κύριες διαδικασίες: (1) χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη DNA από FFPE ή πλάσμα και (2) ενίσχυση PCR και ανίχνευση του DNA στόχου με χρήση ζευγών συμπληρωματικών εκκινητών και ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών επισημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές. Το **cobas** EGFR Test έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση των παρακάτω μεταλλάξεων:

- Εξόνιο 18: G719X (G719A, G719C και G719S)
- Εξόνιο 19: ελλείψεις και σύνθετες μεταλλάξεις (ορίζονται ως συνδυασμός έλλειψης και ένθεσης)
- Εξόνιο 20: S768I, T790M και ενθέσεις
- Εξόνιο 21: L858R και L861Q

Η ανίχνευση μετάλλαξης επιτυγχάνεται μέσω ανάλυσης PCR με τον αναλυτή **cobas® z 480**. Κάθε ανάλυση συμπεριλαμβάνει έναν ορό ελέγχου μετάλλαξης και έναν αρνητικό ορό ελέγχου, για επιβεβαίωση της εγκυρότητας της ανάλυσης.

Προετοιμασία δειγμάτων

Το kit προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas®** και το kit προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®** προορίζονται για χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων από FFPE και πλάσμα αντίστοιχα, με βάση τη δέσμευση του νουκλεϊκού οξέως σε ίνες υάλου. Μια πρωτεάση και ένα χαστροπικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/δέσμευσης απελευθερώνει νουκλεϊκά οξέα και προστατεύει το απελευθερωμένο DNA από DNase. Έπειτα, προστίθεται ισοπροπανόλη στο μίγμα λύσης, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε φυγοκέντριση μέσω στήλης με ένθετο φίλτρο από ίνες υάλου. Κατά τη φυγοκέντριση, το DNA δεσμεύεται στην επιφάνεια του φίλτρου από ίνες υάλου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες, όπως άλατα, πρωτεΐνες και άλλες κυτταρικές ακαθαρσίες, απομακρύνονται με τη φυγοκέντριση. Τα νουκλεϊκά οξέα που έχουν προσροφηθεί υποβάλλονται σε πλύση και, στη συνέχεια, σε έκλυση με υδατικό διάλυμα. Το DNA-στόχος υποβάλλεται, στη συνέχεια, σε ενίσχυση και ανίχνευση στον **cobas® z 480** αναλυτή, με χρήση των αντιδραστηρίων ενίσχυσης και ανίχνευσης που παρέχονται στο kit **cobas** EGFR Test.

Ενίσχυση PCR

Επιλογή στόχου

Το **cobas** EGFR Test χρησιμοποιεί εκκινητές που καθορίζουν ειδικές αλληλουχίες ζευγών βάσεων για καθεμία από τις στοχευμένες μεταλλάξεις. Για τις μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 στοχεύονται αλληλουχίες 125–141 ζευγών βάσεων, για τη μετάλλαξη αντικατάστασης L858R στο εξόνιο 21 στοχεύεται μια αλληλουχία 138 ζευγών βάσεων, για τη μετάλλαξη αντικατάστασης T790M στο εξόνιο 20 στοχεύεται μια αλληλουχία 118 ζευγών βάσεων, για τη μετάλλαξη αντικατάστασης G719X στο εξόνιο 18 στοχεύονται αλληλουχίες 104–106 ζευγών βάσεων, για τη μετάλλαξη αντικατάστασης S768I στο εξόνιο 20 στοχεύεται μια αλληλουχία 133 ζευγών βάσεων, για τις μεταλλάξεις ένθεσης στο εξόνιο 20 στοχεύονται αλληλουχίες 125–143 ζευγών βάσεων, για τη μετάλλαξη αντικατάστασης L861Q στο εξόνιο 21 στοχεύεται μια αλληλουχία 129 ζευγών βάσεων. Η ενίσχυση πραγματοποιείται μόνο στις περιοχές του γονιδίου EGFR μεταξύ των εκκινητών. Δεν ενισχύεται ολόκληρο το γονίδιο EGFR.

Ενίσχυση στόχου

Για την ενίσχυση στόχου χρησιμοποιείται ένα παράγωγο της *Thermus species* Z05-AS1 DNA πολυμεράσης. Αρχικά, το μίγμα PCR θερμαίνεται για την αποδιάταξη του DNA και την έκθεση των αλληλουχιών-στόχων του εκκινητή. Κατά την ψύξη του μίγματος, οι πρόσθιοι και αντίστροφος φοράς εκκινητές υβριδίζονται με τις αλληλουχίες DNA στόχου. Η Z05 DNA πολυμεράση, παρουσία του δισθενούς μεταλλικού κατιόντος και του πλεονάσματος dNTP, επεκτείνει τους υβριδοποιημένους εκκινητές, συνθέτοντας με αυτόν τον τρόπο μια δεύτερη αλυσίδα DNA. Έτσι ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της PCR, με τη δημιουργία ενός δίκλωνου αντιγράφου DNA, το οποίο περιλαμβάνει τις στοχευμένες περιοχές ζευγών βάσεων του γονιδίου EGFR. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων, σε καθέναν από τους οποίους διπλασιάζεται αποτελεσματικά η ποσότητα του προϊόντος DNA (amplicon).

Αυτόματη ανίχνευση μετάλλαξης σε πραγματικό χρόνο

Το **cobas** EGFR Test χρησιμοποιεί τεχνολογία PCR πραγματικού χρόνου. Κάθε ειδικός για το στόχο, ολιγονουκλεοτιδικός ιχνηθέτης που παίρνει μέρος στην αντίδραση είναι σημασμένος με μια φθορίζουσα χρωστική, που χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς (reporter), και με ένα μόριο-παρεμποδιστή (quencher) που απορροφά (παρεμποδίζει) τη φθορίζουσα εκπομπή από τη χρωστική αναφοράς (reporter) σε έναν ανέπαφο ιχνηθέτη. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ενίσχυσης, ο συμπληρωματικός στην αλληλουχία μονόκλωνου DNA ιχνηθέτης στον κλώνο (amplicon) δεσμεύεται και, στη συνέχεια, διασπάται από τη δραστηριότητα νουκλεάσης 5' προς 3' της Z05-AS1 DNA πολυμεράσης. Όταν η χρωστική αναφοράς (reporter) διαχωριστεί από τον παρεμποδιστή (quencher) μέσω αυτής της δραστηριότητας νουκλεάσης, μπορεί να μετρηθεί φθορισμός με χαρακτηριστικό μήκος κύματος κατά τη διέγερση της χρωστικής αναφοράς (reporter) από το κατάλληλο φάσμα φωτός. Για την επισημάνση των μεταλλάξεων που στοχεύονται από την εξέταση χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές χρωστικές αναφοράς (reporter). Η ενίσχυση των επτά στοχευμένων αλληλουχιών EGFR ανιχνεύεται ανεξάρτητα σε τρεις αντιδράσεις με μέτρηση του φθορισμού στα τέσσερα χαρακτηριστικά μήκη κύματος σε ειδικά οπτικά κανάλια.

Επιλεκτική ενίσχυση

Η επιλεκτική ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέως-στόχου από το δείγμα επιτυγχάνεται στο **cobas** EGFR Test με τη χρήση του ενζύμου AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) και της τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (dUTP).¹⁵ Το ένζυμο AmpErase αναγνωρίζει και καταλύει την αποδόμηση των κλώνων του DNA που περιέχουν δεοξουριδίνη, αλλά όχι του DNA που περιέχει θυμιδίνη. Η δεοξουριδίνη δεν υπάρχει στο φυσικό DNA, αλλά υπάρχει πάντοτε στον κλώνο (amplicon) λόγω της χρήσης dUTP, αντί της τριφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης, ως ενός από τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια των αντιδραστηρίων Κύριου Μίγματος. Για το λόγο αυτό, μόνο ο κλώνος (amplicon) περιέχει δεοξουριδίνη. Η δεοξουριδίνη καθιστά το μολυσματικό κλώνο (amplicon) ευαίσθητο στη διάσπαση από το ένζυμο AmpErase πριν από την ενίσχυση του DNA στόχου. Το ένζυμο AmpErase, που περιλαμβάνεται στα αντιδραστήρια Κύριου Μίγματος, καταλύει την απομάκρυνση των καταλοίπων δεοξουριδίνης από το DNA που περιέχει δεοξουριδίνη ανοίγοντας την αλυσίδα της δεοξυριβόζης στη θέση C1. Όταν θερμαίνεται στο πρώτο βήμα θερμοκυκλοποίησης σε αλκαλικό pH, η αλυσίδα DNA του κλώνου (amplicon) διασπάται στη θέση της δεοξουριδίνης, καθιστώντας το DNA μη ενισχύσιμο. Το ένζυμο AmpErase είναι αδρανές σε θερμοκρασία άνω των 55°C, δηλαδή σε όλα τα βήματα της θερμοκυκλοποίησης και, συνεπώς, δεν καταστρέφει τον κλώνο (amplicon) στόχο. Το **cobas** EGFR Test έχει αποδειχτεί ότι αδρανοποιεί τον μεταλλαγμένο κλώνο (amplicon) EGFR που περιέχει δεοξουριδίνη.

ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΟΥ, ΑΚΟΛΟΥΘΗΣΤΕ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΟΤΗΤΑ Α.

ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ, ΑΚΟΛΟΥΘΗΣΤΕ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΝΟΤΗΤΑ Β.

ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΟΥ

Ανατρέξτε στο κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas®** (M/N 05985536190) για την απομόνωση DNA από δείγματα ιστού.

Υλικά και αντιδραστήρια

Παρεχόμενα υλικά και αντιδραστήρια

Κιτ/Κασέτες	Περιεχόμενα και συστατικά αντιδραστηρίων	Ποσότητα ανά εξέταση	Σύμβολο και προειδοποίηση ασφάλειας
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 Εξετάσεις (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Κύριο Μίγμα 1) (M/N 06471366001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I
	EGFR MMX-2 (EGFR Κύριο Μίγμα 2) (M/N 06471382001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I

Κιτ/Κασέτες	Περιεχόμενα και συστατικά αντιδραστηρίων	Ποσότητα ανά εξέταση	Σύμβολο και προειδοποίηση ασφάλειας
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 Εξετάσεις (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Κύριο Μίγμα 3) (M/N 07248610001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I
	MGAC (Οξικό μαγνήσιο) (M/N 05854326001) Οξικό μαγνήσιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου	6 × 0,2 mL	Δ/I
	EGFR MC (Ορός ελέγχου μετάλλαξης EGFR) (M/N 06471455001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris EDTA Poly-rA RNA (συνθετικό) 0,05% Αζίδιο του νατρίου < 0,1% Πλασμιδιακό DNA που περιέχει αλληλουχίες εξωνίων 18, 19, 20 και 21 EGFR (μικροβιακό) < 0,1% DNA άγριου τύπου (wild-type) EGFR (καλλιέργεια κυττάρων)	6 × 0,1 mL	Δ/I
	DNA SD (Αραιωτικό Δείγματος DNA) (M/N 05854474001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,09% Αζίδιο του νατρίου	2 × 3,5 mL	Δ/I

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Αντιδραστήριο	Θερμοκρασία φύλαξης	Χρόνος φύλαξης
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2°C έως 8°C	Μετά το άνοιγμα, παραμένει σταθερό για 4 χρήσεις σε διάστημα 90 ημερών ή μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, όποιο από τα δύο προηγηθεί χρονικά.

* Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και το κύριο μίγμα εργασίας (που προετοιμάζεται με την προσθήκη **MGAC** στο **EGFR MMX-1** ή στο **EGFR MMX-2** ή στο **EGFR MMX-3 v2**) θα πρέπει να προστατεύονται από την παρατεταμένη έκθεση στο φως. Το Κύριο Μίγμα εργασίας θα πρέπει να αποθηκεύεται στους 2°C έως 8°C στο σκοτάδι. Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου που έχουν προετοιμαστεί πρέπει να προστίθενται εντός 1 ώρας από την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας. Η ενίσχυση πρέπει να ξεκινήσει εντός 1 ώρας από την προσθήκη των επεξεργασμένων δειγμάτων και των ορών ελέγχου στο κύριο μίγμα εργασίας.

Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά

Υλικά	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Λευκαντικό	Οποιοδήποτε προμηθευτή
70% Αιθανόλη	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Πλάκα μικροβυθισμάτων (πλάκα AD) και μεμβράνη σφράγισης πλάκας του συστήματος cobas® 4800	Roche 05232724001
Συσκευή τοποθέτησης μεμβράνης σφράγισης συστήματος cobas® 4800 (παρέχεται με την εγκατάσταση του συστήματος cobas® 4800)	Roche 04900383001
Ρυθμιζόμενες συσκευές πιπέτας* (χωρητικότητα 5–1.000 µL)	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Ακροφύσια ελεύθερα από DNase φραγής αερολυμάτων ή θετικής μετατόπισης	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου με καπάκι ασφαλείας (1,5 mL, αποστειρωμένα, χωρίς RNase/DNase, τύπου PCR)	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Υποδοχείς σωληναρίων μικροφυγόκεντρου	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης DNA*	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Αναδευτήρας τύπου Vortex*	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Γάντια μίας χρήσης, χωρίς πούδρα	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Καταψύκτης με δυνατότητα αποθήκευσης στους -25°C έως -15°C	Οποιοδήποτε προμηθευτή

* Όλα τα στοιχεία εξοπλισμού θα πρέπει να συντηρούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα υλικά που πωλούνται χωριστά, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Roche.

Όργανα και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Απαιτούμενα όργανα και λογισμικό, δεν παρέχονται
Αναλυτής cobas® z 480
Μονάδα Ελέγχου Συστήματος cobas® 4800 με Λογισμικό Συστήματος, έκδοση 2.2 ή νεότερης
Λογισμικό πακέτου ανάλυσης EGFR ιστού P1, έκδοση 1.0 ή νεότερη*
Συσκευή Ανάγνωσης Γραμμωτού Κώδικα, εξωτερική με USB
Εκτυπωτής

* Ανατρέξτε στην Κάρτα πληροφοριών προϊόντος του kit **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001) για την τρέχουσα έκδοση λογισμικού.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα υλικά που πωλούνται χωριστά, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Roche.

Προφυλάξεις και απαιτήσεις χειρισμού

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Όπως συμβαίνει με όλες τις διαδικασίες εξέτασης, η ορθή εργαστηριακή πρακτική είναι απαραίτητη για τη σωστή εκτέλεση αυτής της ανάλυσης.

- Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
- Διατίθενται Δελτία Δεδομένων Ασφάλειας (SDS) κατόπιν υποβολής σχετικού αιτήματος στα γραφεία της Roche στην περιοχή σας.
- Η παρούσα εξέταση προορίζεται για χρήση με δείγματα NSCLC FFPE. Τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως μολυσματικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με ασφαλείς εργαστηριακές διαδικασίες, όπως αυτές που περιγράφονται στην τεκμηρίωση Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ και στο έγγραφο CLSI M29-A4.¹⁷
- Συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων πιπέτων μίας χρήσης και ακροφυσίων συσκευής πιπέτας χωρίς DNase.

Ορθή εργαστηριακή πρακτική

- Μην εκτελείτε αναρρόφηση με πιπέτα από το στόμα.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα και η κατανάλωση τροφίμων και ποτών στους χώρους εργασίας του εργαστηρίου.
- Πλένετε καλά τα χέρια σας μετά το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων του κιτ.
- Φοράτε προστατευτικά γυαλιά, ποδιές εργαστηρίου και γάντια μίας χρήσης κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων. Αποφεύγετε την επαφή των υλικών αυτών με το δέρμα, τα μάτια ή τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση επαφής, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονη ποσότητα νερού. Αν δεν υπάρξει άμεση αντιμετώπιση, μπορεί να προκληθούν εγκαύματα. Σε περίπτωση διαρροής αντιδραστηρίου, αραιώστε με νερό πριν το σκουπίσετε.
- Καθαρίζετε καλά και απολυμαίνετε όλες τις επιφάνειες εργασίας του εργαστηρίου με φρέσκο διάλυμα 0,5% υποχλωριώδους νατρίου σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (αραιώστε λευκαντικό οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10). Στη συνέχεια, σκουπίστε την επιφάνεια με 70% αιθανόλη.

Σημείωση: Τα υγρά λευκαντικά οικιακής χρήσης που διατίθενται στο εμπόριο περιέχουν κατά κανόνα υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 5,25%. Με την αραιώση λευκαντικού οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10 παράγεται διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5%.

Επιμόλυνση

- Πρέπει να φοράτε γάντια και να τα αλλάζετε πριν από το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων του cobas EGFR Test, ώστε να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση. Φροντίζετε να μην επιμολύνονται τα γάντια κατά το χειρισμό των δειγμάτων.
- Πρέπει να αλλάζετε γάντια συχνά, για να μειωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης.
- Πρέπει να αλλάζετε γάντια πριν από την έξοδό σας από χώρους απομόνωσης DNA ή σε περίπτωση που αυτά έρθουν σε επαφή με διαλύματα, ή όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης για κάποιο δείγμα.
- Αποφεύγετε την επιμόλυνση των αντιδραστηρίων από μικρόβια και ριβονουκλεάσες.
- Καθαρίζετε καλά το χώρο εργασίας για την ενίσχυση και ανίχνευση πριν από την προετοιμασία του Κύριου Μίγματος εργασίας. Τα υλικά και ο εξοπλισμός θα πρέπει να προορίζονται αποκλειστικά για κάθε μεμονωμένη ενέργεια και όχι για άλλες ενέργειες, ούτε να μεταφέρονται από χώρο σε χώρο. Για παράδειγμα, οι συσκευές πιπέτας και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση DNA δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία αντιδραστηρίων για ενίσχυση και ανίχνευση.

- Συνιστάται ιδιαίτερα η ροή των εργασιών στο εργαστήριο να εκτελείται σε μονόδρομη κατεύθυνση, και να ολοκληρώνετε μία ενέργεια πριν προχωρήσετε στην επόμενη. Για παράδειγμα, η απομόνωση DNA πρέπει να ολοκληρωθεί πριν ξεκινήσει η ενίσχυση και η ανίχνευση. Η απομόνωση DNA θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από ό,τι η ενίσχυση και η ανίχνευση. Για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του κύριου μίγματος εργασίας από δείγματα DNA, ο χώρος εργασίας για την ενίσχυση και την ανίχνευση θα πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά πριν από την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας.

Ορθή χρήση

- Μην χρησιμοποιείτε τα κιτ μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Μην συνδυάζετε αντιδραστήρια από διαφορετικά κιτ ή παρτίδες.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αναλώσιμα μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Όλα τα αναλώσιμα προορίζονται για μία χρήση. Μην τα επαναχρησιμοποιείτε.
- Όλα τα στοιχεία εξοπλισμού θα πρέπει να συντηρούνται κατάλληλα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Απόρριψη

- Τα **MGAC**, **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2**, **EGFR MC** και **DNA SD** περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με το μόλυβδο και το χαλκό των σωληνώσεων και να δημιουργήσει υψηλής εκρηκτικότητας αζίδια μετάλλου. Κατά την απόρριψη διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου στους νεροχύτες των εργαστηρίων, ρίχνετε άφθονη ποσότητα κρύου νερού για να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίου.
- Η απόρριψη μη χρησιμοποιημένων αντιδραστηρίων και απορριμμάτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς.

Διαρροή υγρών και καθαρισμός

- Σε περίπτωση διαρροής υγρού πάνω στο όργανο **cobas® 4800**, ακολουθήστε τις οδηγίες καθαρισμού που περιγράφονται στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.
- Μην χρησιμοποιείτε διάλυμα υποχλωριούχου νατρίου (λευκαντικό) για τον καθαρισμό του αναλυτή **cobas® z 480**. Καθαρίζετε τον αναλυτή **cobas® z 480** σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.
- Για επιπλέον προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες σχετικά με τη μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης για τον αναλυτή **cobas® z 480**, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.

Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη των δειγμάτων

Σημείωση: Όλα τα δείγματα πρέπει να θεωρούνται μολυσματικά και ο χειρισμός τους πρέπει να είναι ανάλογος.

Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα FFPET NSCLC έχουν εγκριθεί για χρήση με το cobas EGFR Test.

Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων

Η μεταφορά των δειγμάτων FFPET NSCLC πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C και να πληροί τους κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς σχετικά με τη μεταφορά αιτιολογικών παραγόντων.¹⁸

Η σταθερότητα των δειγμάτων FFPET έχει επαληθευτεί για διάστημα έως 12 μηνών μετά την ημερομηνία συλλογής, όταν φυλάσσονται σε θερμοκρασία 15°C έως 30°C. Οι τομές 5 μm που είναι τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες μπορούν να αποθηκευτούν στους 15°C έως 30°C για διάστημα έως 60 ημερών.

Τα δείγματα FFPET παραμένουν σταθερά για τα εξής διαστήματα:

Τύπος δείγματος FFPET	Ιστοτεμάχιο FFPET	Τομή FFPET 5 μm
Θερμοκρασία φύλαξης δειγμάτων FFPET	15°C έως 30°C	15°C έως 30°C
Χρόνος φύλαξης	Έως 12 μήνες	Έως 60 ημέρες

Φύλαξη και σταθερότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων

Τα επεξεργασμένα δείγματα (εκχυλισμένο DNA) παραμένουν σταθερά για ένα από τα εξής διαστήματα:

Θερμοκρασία φύλαξης εκχυλισμένου DNA	-15°C έως -25°C	2°C έως 8°C	15°C έως 30°C
Χρόνος φύλαξης	Έως 3 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης σε διάστημα 60 ημερών	Έως 14 ημέρες	Έως 1 ημέρα

Το εκχυλισμένο DNA πρέπει να χρησιμοποιείται εντός των συνιστώμενων διαστημάτων φύλαξης ή πριν από την ημερομηνία λήξης του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA cobas® που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του DNA, όποιο από τα δύο προηγηθεί χρονικά.

Διαδικασία εξέτασης

Εκτέλεση της εξέτασης

Εικόνα 1 Ροή εργασίας cobas EGFR Test με το κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA cobas®

1	Εκκινήστε το σύστημα.
2	Εκτελέστε συντήρηση του οργάνου.
3	Αφαιρέστε τα δείγματα και τα αντιδραστήρια από τον χώρο φύλαξης.
4	Εκτελέστε αποπαραφίνωση των δειγμάτων.
5	Πραγματοποιήστε απομόνωση του DNA.
6	Πραγματοποιήστε έκλυση του DNA.
7	Δημιουργήστε μια εντολή εργασίας και εκτυπώστε τη διάταξη της πλάκας.
8	Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια ενίσχυσης.
9	Τοποθετήστε τα αντιδραστήρια ενίσχυσης στην πλάκα μικροβυθισμάτων (AD)
10	Τοποθετήστε το δείγμα στην πλάκα AD
11	Σφραγίστε την πλάκα AD
12	Τοποθετήστε την πλάκα AD στον αναλυτή cobas® z 480
13	Ξεκινήστε την ανάλυση.
14	Εξετάστε τα αποτελέσματα.
15	Με χρήση LIS: Αποστέλλετε τα αποτελέσματα στο σύστημα LIS.
16	Αφαιρέστε την πλάκα από τον αναλυτή.

Οδηγίες χρήσης

Σημείωση: Στο **cobas EGFR Test** μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο τμήματα **FFPET NSCLC** πάχους 5 μm με τουλάχιστον 10% περιεχόμενο καρκινικού ιστού κατά εμβадόν. Οποιοδήποτε δείγμα διαθέτει κάτω από 10% περιεχόμενο καρκινικού ιστού κατά εμβадόν θα πρέπει να υποβάλλεται σε μακροεκτομή μετά από αποπαραφίνωση.

Σημείωση: Για λεπτομερείς οδηγίες λειτουργίας του αναλυτή **cobas® z 480**, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.

Αριθμός αναλύσεων

Μια μεμονωμένη ανάλυση μπορεί να περιλαμβάνει από 1 έως 30 δείγματα (συν τους ορούς ελέγχου) ανά πλάκα μικροβυθισμάτων 96 βυθισμάτων. Όταν αναλύονται περισσότερα από 24 δείγματα, απαιτούνται πολλά κιτ **cobas EGFR Test**.

Το **cobas EGFR Test** περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για 8 αναλύσεις 3 δειγμάτων (συν τους ορούς ελέγχου) για μέγιστο αριθμό 24 δειγμάτων ανά κιτ.

Ορός ελέγχου πλήρους επεξεργασίας

Αυτή η εξέταση απαιτεί ορό ελέγχου πλήρους επεξεργασίας. Για κάθε ανάλυση, επεξεργαστείτε έναν αρνητικό ορό ελέγχου παράλληλα με το(τα) δείγμα(-τα) ξεκινώντας με τη διαδικασία **απομόνωσης DNA**.

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα FFPET πραγματοποιείται με το κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® (M/N 05985536190).

Μακροεκτομή

Εάν το δείγμα διαθέτει κάτω από 10% περιεχόμενο καρκινικού ιστού κατά εμβадόν, το δείγμα θα πρέπει να υποβάλλεται σε μακροεκτομή στο πλαίσιο της προετοιμασίας του.

Ποσοτικοποίηση DNA

Σημείωση: Η μέτρηση της συγκέντρωσης DNA θα πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως μετά τη διαδικασία απομόνωσης DNA και πριν από τη φύλαξη.

Σημείωση: Φυλάσσετε το αρχικό δείγμα DNA σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα «Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων».

1. Αναμίξτε κάθε αρχικό δείγμα DNA στροβιλίζοντας για 5 δευτερόλεπτα.
2. Εκτελέστε ποσοτικοποίηση DNA χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήστε **DNA EB** από το κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® ως τυφλό για το όργανο. Απαιτείται ο μέσος όρος δύο κοντινών μεταξύ τους τιμών. Η απόκλιση μεταξύ των δύο μετρήσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 10\%$ όταν οι τιμές συγκέντρωσης DNA είναι $\geq 20,0$ ng/ μ L. Για τιμές συγκέντρωσης DNA $< 20,0$ ng/ μ L, η απόκλιση μεταξύ των δύο μετρήσεων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα ± 2 ng/ μ L. Εάν η απόκλιση μεταξύ των δύο μετρήσεων υπερβαίνει το $\pm 10\%$, όταν οι τιμές συγκέντρωσης DNA είναι $\geq 20,0$ ng/ μ L, ή το ± 2 ng/ μ L όταν οι τιμές συγκέντρωσης DNA είναι $< 20,0$ ng/ μ L, θα πρέπει να ληφθούν επιπλέον 2 τιμές μέχρι να πληρούνται οι προϋποθέσεις. Στη συνέχεια, θα πρέπει να υπολογιστεί ο μέσος όρος αυτών των δύο νέων μετρήσεων.

Σημείωση: Δεν απαιτείται μέτρηση του αρχικού δείγματος DNA από τον επεξεργασμένο αρνητικό ορό ελέγχου (NEG).

3. Η συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα DNA από τα δείγματα πρέπει να είναι ≥ 2 ng/ μ L για να είναι δυνατή η εκτέλεση του **cobas** EGFR Test. Για κάθε δείγμα εκτελούνται τρεις ενισχύσεις/ανιχνεύσεις, χρησιμοποιώντας 25 μ L αραιώσης 2 ng/ μ L αρχικού δείγματος DNA (συνολικά 50 ng DNA) για κάθε ενίσχυση/ανίχνευση.

Σημείωση: Κάθε αρχικό δείγμα DNA πρέπει να διαθέτει ελάχιστη συγκέντρωση 2 ng/ μ L για να είναι δυνατή η εκτέλεση του **cobas** EGFR Test. Εάν η συγκέντρωση σε ένα αρχικό δείγμα DNA είναι < 2 ng/ μ L, επαναλάβετε τις διαδικασίες αποπαραφίνωσης, απομόνωσης DNA και ποσοτικοποίησης DNA για το δείγμα αυτό χρησιμοποιώντας δύο τομές FFPET 5 μ m. Για δείγματα που έχουν τοποθετηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα, μετά την αποπαραφίνωση, συνδυάστε τον ιστό και από τις δύο τομές σε ένα σωληνάριο, εμβαπτίστε τον ιστό σε **TLB + PK** από το κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® και εκτελέστε την απομόνωση και ποσοτικοποίηση του DNA. Για δείγματα που δεν έχουν τοποθετηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα, συνδυάστε τον ιστό και από τις δύο τομές σε ένα σωληνάριο και εκτελέστε αποπαραφίνωση, απομόνωση και ποσοτικοποίηση του DNA. Εάν η συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα DNA εξακολουθεί να είναι < 2 ng/ μ L, ζητήστε μια άλλη τομή δείγματος FFPET από το παραπέμπον κλινικό τμήμα.

Ενίσχυση και ανίχνευση

Σημείωση: Για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση του κύριου μίγματος εργασίας με δείγματα DNA, η ενίσχυση και η ανίχνευση θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνο στον οποίο πραγματοποιείται η απομόνωση DNA. Καθαρίζετε καλά το χώρο εργασίας για την ενίσχυση και ανίχνευση πριν από την προετοιμασία του Κύριου Μίγματος εργασίας. Για σωστό καθαρισμό, θα πρέπει να σκουπίζετε καλά όλες τις επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων και των συσκευών πιπέτας, με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% και, στη συνέχεια, με διάλυμα αιθανόλης 70%. Τα υγρά λευκαντικά οικιακής χρήσης που διατίθενται στο εμπόριο περιέχουν κατά κανόνα υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 5,25%. Με την αραιώση λευκαντικού οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10 παράγεται διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5%.

Ρύθμιση του οργάνου

Για λεπτομερείς οδηγίες ρύθμισης του cobas® z 480, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800.

Ρύθμιση εντολής εξέτασης

Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τα βήματα της ροής εργασιών EGFR, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800.

Δημιουργήστε έναν χάρτη πλάκας με τις θέσεις όλων των δειγμάτων και των ορών ελέγχου της ανάλυσης. Σε μια ανάλυση που περιλαμβάνει μόνο δείγματα ιστού, ο Όρος ελέγχου μετάλλαξης τοποθετείται στις θέσεις **A01–A03** της πλάκας. Ο αρνητικός όρος ελέγχου τοποθετείται στις θέσεις **B01–B03** της πλάκας. Έπειτα, τα αραιωμένα δείγματα προστίθενται σε σετ 3 στηλών, ξεκινώντας από τις θέσεις **C01–C03** έως **H10–H12**, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.

Η ανάλυση με το cobas EGFR Test μπορεί να γίνει σε μικτή λειτουργία (π.χ. εξέταση ιστού EGFR με εξέταση πλάσματος EGFR). Οι θέσεις του ορού ελέγχου ποικίλλουν ανάλογα με τις επιλεγμένες εξετάσεις και τους αριθμούς των δειγμάτων. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800, για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία μιας ανάλυσης με μικτές εξετάσεις.

Σχήμα 2 Διάταξη της πλάκας για το cobas EGFR Test

Σειρά / Στήλη	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

Όπου: MC = Όρος ελέγχου μετάλλαξης, NEG = Αρνητικός όρος ελέγχου, S# = ID δείγματος και MMX # αντιστοιχεί στο αντιδραστήριο κύριου μίγματος 1, 2 ή 3 v2.

Σημείωση: Κάθε δείγμα θα πρέπει να κατανέμεται σε τρεις συνεχόμενες στήλες σε μία σειρά, ώστε να δοθεί αποτέλεσμα.

Σημείωση: Το κύριο μίγμα εργασίας 1 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 01, 04, 07 και 10 της πλάκας. Το κύριο μίγμα εργασίας 2 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 02, 05, 08 και 11 της πλάκας. Το κύριο μίγμα εργασίας 3 v2 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 03, 06, 09 και 12 της πλάκας.

Σημείωση: Σε μία πλάκα μπορούν να τοποθετηθούν έως 30 δείγματα. Εάν απαιτούνται περισσότερα από ένα κιτ αντιδραστηρίων για την επεξεργασία όλων των δειγμάτων της πλάκας, τότε τα κιτ θα πρέπει να προέρχονται όλα από την ίδια παρτίδα.

Υπολογισμός αραίωσης του αρχικού δείγματος DNA

Υπολογισμός αραίωσης για συγκεντρώσεις αρχικού δείγματος DNA από 2 ng/μL έως 36 ng/μL

Σημείωση: Τα αρχικά δείγματα DNA θα πρέπει να αραιώνονται αμέσως πριν από την ενίσχυση και ανίχνευση.

Σημείωση: Για κάθε δείγμα εκτελούνται τρεις ενισχύσεις/ανιχνεύσεις, για τις οποίες απαιτείται συνολικός όγκος 75 μL (25 μL για καθεμία από τις τρεις αντιδράσεις) αραίωσης 2 ng/μL αρχικού δείγματος DNA (συνολικά 150 ng DNA).

1. Για κάθε δείγμα, υπολογίστε τον απαιτούμενο όγκο (μL) αρχικού δείγματος DNA:
$$\mu\text{L αρχικού δείγματος DNA} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{συγκέντρωση αρχικού δείγματος DNA [ng}/\mu\text{L]}$$
2. Για κάθε δείγμα, υπολογίστε τον απαιτούμενο όγκο (μL) **DNA SD**:
$$\mu\text{L DNA SD} = 90 \mu\text{L} - \mu\text{L αρχικού δείγματος DNA}$$

Παράδειγμα:

Συγκέντρωση αρχικού δείγματος DNA = 6,5 ng/μL

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

Υπολογισμός αραίωσης για συγκεντρώσεις αρχικού δείγματος DNA > 36 ng/μL

Σημείωση: Τα αρχικά δείγματα DNA θα πρέπει να αραιώνονται αμέσως πριν από την ενίσχυση και ανίχνευση.

Σημείωση: Για κάθε δείγμα εκτελούνται τρεις ενισχύσεις/ανιχνεύσεις, για τις οποίες απαιτείται συνολικός όγκος 75 μL (25 μL για καθεμία από τις τρεις αντιδράσεις) αραίωσης 2 ng/μL αρχικού δείγματος DNA (συνολικά 150 ng DNA).

1. Για συγκεντρώσεις αρχικού δείγματος DNA > 36 ng/μL, χρησιμοποιήστε τον παρακάτω τύπο για να υπολογίσετε την ποσότητα **DNA SD** που απαιτείται για την προετοιμασία τουλάχιστον 90 μL αραιωμένου αρχικού δείγματος DNA. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ότι για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 5 μL αρχικού δείγματος DNA.
2. Για κάθε δείγμα, υπολογίστε τον όγκο (μL) **DNA SD** που απαιτείται για την αραίωση 5 μL αρχικού δείγματος DNA στα 2 ng/μL:

$$\text{Όγκος DNA SD που απαιτείται σε } \mu\text{L} = [(5 \mu\text{L αρχικού δείγματος DNA} \times \text{συγκέντρωση αρχικού δείγματος DNA σε ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}] - 5 \mu\text{L}$$

Παράδειγμα:

Συγκέντρωση αρχικού δείγματος DNA = 100 ng/μL

1. Όγκος **DNA SD** που απαιτείται σε μL = $[(5 \mu\text{L} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}] - 5 \mu\text{L} = 245 \mu\text{L}$
2. Χρησιμοποιήστε την υπολογισμένη τιμή όγκου **DNA SD** για να αραιώσετε 5 μL αρχικού δείγματος DNA.

Αραιώση δείγματος

1. Προετοιμάστε τον κατάλληλο αριθμό σωληναρίων μικροφυγόκεντρου 1,5 mL με καπάκι ασφαλείας για αραιώσεις DNA επισημαίνοντάς τα με το κατάλληλο αναγνωριστικό δείγματος.
2. Χρησιμοποιώντας μια συσκευή πιπέτας με ακροφύσιο ανθεκτικό στα αερολύματα, εκτελέστε έγχυση των όγκων **DNA SD** στα σωληνάρια με την αντίστοιχη επισημάνση. Διοχετεύστε με πιπέτα 45 µL **DNA SD** σε ένα σωληνάριο μικροφυγόκεντρου με καπάκι ασφαλείας με την επισημάνση **NEG**.
3. Περιδινήστε κάθε αρχικό δείγμα DNA και τον αρνητικό ορό ελέγχου για 5 έως 10 δευτερόλεπτα.
4. Χρησιμοποιώντας μια συσκευή πιπέτας με ακροφύσιο πιπέτας ανθεκτικό στα αερολύματα (νέο ακροφύσιο για κάθε έγχυση με πιπέτα), εκτελέστε σταδιακά έγχυση του υπολογισμένου όγκου για κάθε αρχικό δείγμα DNA στο αντίστοιχο σωληνάριο που περιέχει **DNA SD**. Εκτελέστε έγχυση 45 µL αρνητικού ορού ελέγχου (εκχυλισμένο έκλουσμα) στο σωληνάριο **NEG**.
5. Πωματίστε τα σωληνάρια και περιδινήστε το καθένα για 5 έως 10 δευτερόλεπτα.
6. Αλλάζτε γάντια.

Προετοιμασία αντίδρασης

Προετοιμασία των κύριων μιγμάτων εργασίας (MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2)

Σημείωση: Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και το κύριο μίγμα εργασίας είναι ευαίσθητα στο φως και πρέπει να προστατεύονται από παρατεταμένη έκθεση στο φως.

Σημείωση: Λόγω του ιξώδους των αντιδραστηρίων **EGFR MMX** και του κύριου μίγματος εργασίας, η έγχυση με πιπέτα θα πρέπει να πραγματοποιείται αργά, ώστε να διοχετεύεται ολόκληρη η ποσότητα μίγματος από το ακροφύσιο.

Σημείωση: Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** και **EGFR MMX-3 v2** ενδέχεται να διαθέτουν γαλάζια/πορφυροειδή όψη. Αυτό δεν επηρεάζει την απόδοση του αντιδραστηρίου.

Προετοιμάστε τρεις κύριες ποσότητες κύριου μίγματος εργασίας, μία με **EGFR MMX-1**, μία με **EGFR MMX-2** και μία με **EGFR MMX-3 v2**, σε ξεχωριστά σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 mL με καπάκι ασφαλείας.

1. Υπολογίστε τον όγκο του **EGFR MMX-1** ή **EGFR MMX-2** ή του **EGFR MMX-3 v2** που απαιτείται για κάθε κύριο μίγμα εργασίας, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απαιτούμενος όγκος του EGFR MMX-1 ή του EGFR MMX-2 ή του EGFR MMX-3 v2} = (\text{αριθμός δειγμάτων} + 2 \text{ οροί ελέγχου} + 1) \times 20 \text{ }\mu\text{L}$$

2. Υπολογίστε τον όγκο **MGAC** που απαιτείται για κάθε κύριο μίγμα εργασίας, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απαιτούμενος όγκος MGAC} = (\text{αριθμός δειγμάτων} + 2 \text{ οροί ελέγχου} + 1) \times 5 \text{ }\mu\text{L}$$

Ο Πίνακας 4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του όγκου κάθε αντιδραστηρίου που απαιτείται για την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας βάσει του αριθμού δειγμάτων που περιλαμβάνονται στην ανάλυση.

Πίνακας 4 Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για τα μίγματα εργασίας MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2

		Αριθμός δειγμάτων*									
		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
Συνολικός όγκος για κάθε Κύριο Μίγμα Εργασίας (µL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Όγκοι για αριθμό δειγμάτων βάσει του αθροίσματος του αριθμού δειγμάτων + 2 οροί ελέγχου + 1

3. Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό φιαλιδίων **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και **MGAC** από το χώρο φύλαξης σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C. Περιδινήστε κάθε αντιδραστήριο για 5 δευτερόλεπτα και συγκεντρώστε το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου πριν από τη χρήση. Επισημάνετε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου για το μίγμα εργασίας MMX-1, το μίγμα εργασίας MMX-2 και το μίγμα εργασίας MMX-3 v2.
4. Προσθέστε τον υπολογισμένο όγκο **EGFR MMX-1** ή **EGFR MMX-2** ή **EGFR MMX-3 v2** στα αντίστοιχα σωληνάρια κύριου μίγματος εργασίας.
5. Προσθέστε τον υπολογισμένο όγκο **MGAC** στα σωληνάρια κύριου μίγματος εργασίας.
6. Περιδινήστε τα σωληνάρια για 3 έως 5 δευτερόλεπτα, για να διασφαλίσετε επαρκή ανάμιξη.

Σημείωση: Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου θα πρέπει να προστίθενται στην πλάκα AD εντός 1 ώρας μετά από την προετοιμασία των κύριων μιγμάτων εργασίας.

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε μόνο την πλάκα AD και τη μεμβράνη σφράγισης του συστήματος **cobas® 4800**.

Προετοιμασία της πλάκας

1. Διοχετεύστε με πιπέτα 25 µL κύριου μίγματος εργασίας σε κάθε βύθισμα αντίδρασης της πλάκας AD το οποίο απαιτείται για την ανάλυση. Μην αφήνετε το ακροφύσιο της συσκευής πιπέτας να έρθει σε επαφή με την πλάκα εκτός του βυθίσματος.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-1 (που περιέχει **EGFR MMX-1**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 01, 04, 07 και 10, όπως απαιτείται.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-2 (που περιέχει **EGFR MMX-2**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 02, 05, 08 και 11, όπως απαιτείται.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-3 v2 (που περιέχει **EGFR MMX-3 v2**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 03, 06, 09 και 12, όπως απαιτείται.
2. Διοχετεύστε με πιπέτα 25 µL **EGFR MC** στα βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03** της πλάκας AD. Αναμίξτε καλά χρησιμοποιώντας την πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και διοχέτευση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές.
3. Χρησιμοποιώντας νέο ακροφύσιο συσκευής πιπέτας, εκτελέστε έγχυση 25 µL **NEG** στα βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03** της πλάκας AD. Αναμίξτε καλά χρησιμοποιώντας την πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και διοχέτευση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές.

Σημείωση: Κάθε ανάλυση πρέπει να περιέχει **EGFR MC** στα βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03** και **NEG** στα βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03**, διαφορετικά η ανάλυση θα καθίσταται άκυρη από τον **cobas® z 480** αναλυτή.

Σημείωση: Αλλάζετε γάντια, όπως απαιτείται, για προστασία έναντι της επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα και της εξωτερικής επιμόλυνσης του σωληναρίου αντίδρασης PCR.

4. Χρησιμοποιώντας νέα ακροφύσια συσκευής πιπέτας για κάθε αραιωμένο DNA δείγματος, προσθέστε 25 µL από το DNA του πρώτου δείγματος στα βυθίσματα **C01**, **C02** και **C03** της πλάκας AD, χρησιμοποιώντας νέο ακροφύσιο για την προσθήκη του DNA δείγματος σε κάθε βύθισμα. Αναμίξτε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και χορήγηση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές. Επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για το DNA κάθε δείγματος και ακολουθήστε το πρότυπο στο Σχήμα 2 μέχρι να φορτώσετε όλες τις αραιώσεις δειγμάτων DNA στην πλάκα AD. Βεβαιωθείτε ότι όλο το υγρό έχει συγκεντρωθεί στον πυθμένα των βυθισμάτων.
5. Καλύψτε την πλάκα AD με μεμβράνη σφράγισης πλάκας (παρέχεται μαζί με τις πλάκες). Χρησιμοποιήστε τη συσκευή τοποθέτησης μεμβράνης σφράγισης, για να σφραγίσετε σταθερά την πλάκα AD με τη μεμβράνη.

6. Βεβαιωθείτε ότι όλο το υγρό έχει συγκεντρωθεί στον πυθμένα κάθε βυθίσματος πριν από την έναρξη της διαδικασίας PCR.

Σημείωση: Η ενίσχυση και η ανίχνευση θα πρέπει να ξεκινήσουν εντός 1 ώρας μετά την προσθήκη της αραίωσης του πρώτου DNA δείγματος στο κύριο μίγμα εργασίας.

Έναρξη διαδικασίας PCR

Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τα βήματα της ροής εργασιών EGFR, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas®** 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas®** 4800. Όταν εμφανιστεί το αναδυόμενο παράθυρο Select test, επιλέξτε EGFR Tissue P1 και κάντε κλικ στο κουμπί OK.

Αποτελέσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Σημείωση: Η επαλήθευση όλων των αναλύσεων και δειγμάτων πραγματοποιείται από το **cobas® 4800** λογισμικό.

Σημείωση: Μια έγκυρη ανάλυση εξέτασης μπορεί να περιλαμβάνει έγκυρα και μη έγκυρα αποτελέσματα δειγμάτων.

Για μια έγκυρη ανάλυση, τα αποτελέσματα δειγμάτων ερμηνεύονται όπως δείχνει ο Πίνακας 5.

Πίνακας 5 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων για το **cobas EGFR Test**

Αποτέλεσμα Εξέτασης	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Ερμηνεία
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Ενδέχεται να υπάρχουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις)	Ανιχνεύτηκε μετάλλαξη σε καθορισμένη στοχευμένη περιοχή EGFR.
No Mutation Detected (NMD)*	Δ/Ι	Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στις στοχευμένες περιοχές EGFR.
Μη έγκυρο	Δ/Ι	Το αποτέλεσμα του δείγματος δεν είναι έγκυρο. Επαναλάβετε την εξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στην παρακάτω ενότητα Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα .
Failed	Δ/Ι	Η ανάλυση απέτυχε λόγω σφάλματος υλικού εξοπλισμού ή λογισμικού. Επικοινωνήστε με τα τοπικά γραφεία της Roche για την παροχή τεχνικής υποστήριξης.

* Ένα αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μετάλλαξης («No Mutation Detected») δεν αποκλείει την παρουσία μετάλλαξης στις στοχευμένες περιοχές EGFR, καθώς τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το ποσοστό μεταλλαγμένων αλληλουχιών, την επάρκεια και ποιότητα του δείγματος, την απουσία αναστολέων και την επαρκή ποσότητα DNA για ανίχνευση.

Οι ενδείξεις αποτελεσμάτων βρίσκονται στην καρτέλα (οθόνη) Result ή στη στήλη (αναφορά) Flags. Ανατρέξτε στην ενότητα **Ενδείξεις αποτελεσμάτων** για περισσότερες πληροφορίες.

Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα

- Επαναλάβετε την αραίωση του μη έγκυρου αρχικού δείγματος DNA ξεκινώντας από τις διαδικασίες «Υπολογισμός αραίωσης του αρχικού δείγματος DNA» και «Αραίωση δειγμάτων» στην ενότητα **Ενίσχυση και ανίχνευση**.
- Μετά την εκτέλεση της αραίωσης αρχικού δείγματος DNA στα 2 ng/μL που περιγράφεται στην ενότητα «Αραίωση δειγμάτων», συνεχίστε με τη διαδικασία «Προετοιμασία των κύριων μιγμάτων εργασίας (MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2)» και ακολουθήστε την υπόλοιπη διαδικασία ενίσχυσης και ανίχνευσης.

Σημείωση: Εάν το δείγμα παραμείνει μη έγκυρο μετά την επανεξέταση ή εάν δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα αρχικού δείγματος DNA για την προετοιμασία άλλης αραίωσης στη διαδικασία **Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα**, βήμα 1, επαναλάβετε ολόκληρη τη διαδικασία εξέτασης για αυτό το δείγμα, ξεκινώντας με αποπαραφίνωση και απομόνωση DNA, χρησιμοποιώντας νέα τομή όγκου FFPE 5 μm.

Ποιοτικός έλεγχος και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

Κάθε ανάλυση έως 30 δειγμάτων περιλαμβάνει ένα σετ ορού ελέγχου μετάλλαξης του **cobas** EGFR Test (**EGFR MC**) (βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03**) και αρνητικού ορού ελέγχου (**NEG**) (βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03**) για τα κύρια μίγματα εργασίας MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2. Μια ανάλυση είναι έγκυρη εάν ο **EGFR MC** και ο **NEG** είναι έγκυροι. Εάν ένας **EGFR MC** ή ένας **NEG** δεν είναι έγκυρος, ολόκληρη η ανάλυση είναι μη έγκυρη και πρέπει να επαναληφθεί. Προετοιμάστε μια νέα αραίωση του αρχικού δείγματος DNA του δείγματος που έχει ήδη απομονωθεί, για να ετοιμάσετε μια νέα πλάκα AD με ορούς ελέγχου για ενίσχυση και ανίχνευση.

Ορός ελέγχου μετάλλαξης

Το αποτέλεσμα του **EGFR MC** πρέπει να είναι έγκυρο («Valid»). Αν τα αποτελέσματα του **EGFR MC** είναι διαρκώς μη έγκυρα, επικοινωνήστε με το τοπικό γραφείο της Roche για τεχνική υποστήριξη.

Αρνητικός ορός ελέγχου

Το αποτέλεσμα του **NEG** πρέπει να είναι έγκυρο («Valid»). Αν τα αποτελέσματα του **NEG** είναι διαρκώς μη έγκυρα, επικοινωνήστε με το τοπικό γραφείο της Roche για τεχνική υποστήριξη.

Περιορισμοί της διαδικασίας

1. Εξετάστε μόνο τους ενδεδειγμένους τύπους δειγμάτων. Το **cobas** EGFR Test έχει εγκριθεί για χρήση μόνο με καρκινικά δείγματα FFPE NSCLC.
2. Το **cobas** EGFR Test έχει εγκριθεί μόνο με χρήση του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® (Roche P/N: 05985536190).
3. Η ανίχνευση μετάλλαξης εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων στο δείγμα και μπορεί να επηρεαστεί από την ποιότητα του δείγματος, την ποσότητα απομονωμένου DNA και την ύπαρξη ουσιών που αλληλεπιδρούν.
4. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από τις ορθές διαδικασίες μονιμοποίησης του υλικού, μεταφοράς, φύλαξης και επεξεργασίας των δειγμάτων. Ακολουθήστε τις διαδικασίες που αναφέρονται στις Οδηγίες Χρήσης του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® (M/N 05985536190), στις παρούσες Οδηγίες Χρήσης και στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas**® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήση του συστήματος **cobas**® 4800.
5. Οι επιδράσεις άλλων ενδεχόμενων μεταβλητών, όπως οι μεταβλητές μονιμοποίησης του υλικού του δείγματος, δεν έχουν αξιολογηθεί.
6. Η προσθήκη του ενζύμου AmpErase στο κύριο μίγμα του **cobas** EGFR Test επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση του DNA-στόχου. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η εφαρμογή ορθών εργαστηριακών πρακτικών και η προσεκτική συμμόρφωση προς τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παρούσες Οδηγίες χρήσης, για την αποφυγή επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων.
7. Αυτό το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από προσωπικό εκπαιδευμένο στις τεχνικές PCR και στη χρήση του συστήματος **cobas**® 4800.
8. Μόνο ο αναλυτής **cobas**® z 480 έχει εγκριθεί για χρήση με αυτό το προϊόν. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλος θερμοκυκλοποιητής με οπτική ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο με το προϊόν αυτό.
9. Λόγω εγγενών διαφορών μεταξύ των τεχνολογιών, πριν από τη μετάβαση σε άλλη τεχνολογία, συνιστάται η πραγματοποίηση μελετών συσχέτισμού μεθόδων από το χειριστή στο εργαστήριο για τον ποιοτικό προσδιορισμό των διαφορών τεχνολογίας.
10. Η παρουσία αναστολέων PCR μπορεί να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά ή άκυρα αποτελέσματα.

11. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τυχόν μεταλλάξεις στις περιοχές γονιδιωματικού DNA του γονιδίου EGFR, που καλύπτονται από τους εκκινητές ή τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στο **cobas** EGFR Test, ενδέχεται να οδηγήσουν σε αποτυχία ανίχνευσης της παρουσίας μετάλλαξης στα εξώνια 18, 19, 20, 21 (αποτελέσματα «No Mutation Detected»).
12. Το **cobas** EGFR Test παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση (cross reactivity — αποτελέσματα «Mutation Detected») με τη μετάλλαξη L747S του εξωνίου 19, μια σπάνια επίκτητη μετάλλαξη η οποία μπορεί να προσδώσει ανθεκτικότητα στη θεραπεία με TKI.¹⁹
13. Το **cobas** EGFR Test έχει εγκριθεί για χρήση με 50 ng DNA ανά βύθισμα αντίδρασης. Δεν συνιστώνται ποσότητες DNA εισαγωγής μικρότερες από 50 ng ανά βύθισμα αντίδρασης.
14. Το **cobas** EGFR Test είναι μια ποιοτική εξέταση. Η εξέταση δεν προορίζεται για ποσοτικές μετρήσεις ποσοστού μετάλλαξης.
15. Τα δείγματα FFPET NSCLC που περιέχουν αποδομημένο DNA μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα της εξέτασης να ανιχνεύει τις μεταλλάξεις EGFR.
16. Δείγματα με αποτελέσματα τύπου «No Mutation Detected» μπορεί να φέρουν μεταλλάξεις του EGFR που δεν ανιχνεύονται από την ανάλυση.
17. Το **cobas** EGFR Test ανιχνεύει μεταλλάξεις του EGFR σε ασθενείς με NSCLC των οποίων οι όγκοι έχουν αντικαταστάσεις (G719X) στο εξώνιο 18, ελλείψεις στο εξώνιο 19, ενθέσεις και αντικαταστάσεις (T790M, S768I) στο εξώνιο 20 και αντικαταστάσεις (L858R, L861Q) στο εξώνιο 21, αλλά καμία άλλη μετάλλαξη του EGFR.

Αξιολόγηση απόδοσης μη κλινικών δειγμάτων

Σημείωση: Οι παρακάτω περιγραφές μελετών περιλαμβάνουν αθροιστικά δεδομένα προερχόμενα από τη χρήση των εκδόσεων v1 και v2 του **cobas** EGFR Test.

Για τις μη κλινικές μελέτες που περιγράφονται παρακάτω, αξιολογήθηκε το % περιεχόμενο όγκου με μεθόδους παθολογικής ανατομικής (pathology review). Για την επιλογή των προς εξέταση δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αμφίδρομη ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger και ανάλυση αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS). Το ποσοστό μετάλλαξης του δείγματος NSCLC FFPET προσδιορίστηκε με τη χρήση μιας μεθόδου NGS.

Αναλυτική ευαισθησία — όριο τυφλού

Για να αξιολογηθεί η απόδοση του **cobas** EGFR Test απουσία προτύπου και να διασφαλιστεί ότι ένα τυφλό δείγμα δεν θα παράγει αναλυτικό σήμα που μπορεί να υποδηλώνει μετάλλαξη χαμηλής συγκέντρωσης, αξιολογήθηκαν δείγματα χωρίς πρότυπο και δείγματα NSCLC FFPET EGFR άγριου τύπου (wild-type). Με χρήση της ανάλυσης που περιγράφεται στην οδηγία CLSI EP17-A2²⁰, το όριο τυφλού βρέθηκε μηδενικό για όλες τις μεταλλάξεις.

Όριο ανίχνευσης με χρήση των μιγμάτων δειγμάτων FFPET

Τρία εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τις μεταλλάξεις τύπου έλλειψης στο εξόνιο 19, τέσσερα εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τη μετάλλαξη L858R, δύο διπλά εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τις μεταλλάξεις L858R και T790M, δύο εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τη μετάλλαξη G719A, ένα διπλό εκχύλισμα DNA δείγματος FFPET για τις μεταλλάξεις T790M και G719A, ένα διπλό εκχύλισμα DNA δείγματος FFPET για τις μεταλλάξεις G719C και S768I, ένα διπλό εκχύλισμα DNA δείγματος FFPET για τις μεταλλάξεις S768I και G719S, τρία εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τη μετάλλαξη τύπου ένθεσης στο εξόνιο 20 και τρία εκχυλίσματα DNA δείγματος FFPET για τη μετάλλαξη L861Q αναμίχθηκαν με εκχυλίσματα δειγμάτων FFPET άγριου τύπου (wild-type) EGFR ώστε να προκύψουν μίγματα με δείγματα με στοχευμένο επίπεδο μετάλλαξης 10, 5,0, 2,5 και 1,25%, όπως προσδιορίστηκε από τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), η οποία έχει εγκριθεί για χρήση στην ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR στα εξόνια 18, 19, 20 και 21. Προετοιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις από κάθε μίγμα δειγμάτων και υποβλήθηκαν σε ανάλυση οκτώ αντίγραφα από κάθε στοιχείο του πίνακα, χρησιμοποιώντας καθεμία από τις τρεις παρτίδες kit **cobas** EGFR Test (n = 24/στοιχείο πίνακα). Το όριο ανίχνευσης κάθε δείγματος προσδιορίστηκε βάσει της χαμηλότερης ποσότητας DNA που έδωσε αποτέλεσμα EGFR «Mutation Detected» κατά τουλάχιστον 95% για τη στοχευμένη μετάλλαξη, όπως δείχνει ο Πίνακας 6.

Πίνακας 6 Όριο ανίχνευσης για το cobas EGFR Test με χρήση μιγμάτων δειγμάτων FFPE

Εξώνιο EGFR	Ομάδα Μεταλλάξεων EGFR	Αλληλουχία Νουκλεϊκού Οξέως EGFR	Ποσοστό Μετάλλαξης στο Στοιχείο Πίνακα για να επιτευχθεί ποσοστό «Mutation Detected» ≥ 95% με εισαγωγή 50 ng DNA ανά βύθισμα αντίδρασης (N = 24 αντίγραφα)	COSMIC ID ¹⁴
18	G719X	2156 G>C	2,5	6239
		2156 G>C	4,7	6239
		2155 G>A	3,2	6252
		2155 G>T	5,6	6253
19	Έλλειψη στο Εξώνιο 19	2235_2249del15	1,4	6223
		2236_2250del15	2,5	6225
		2239_2256del18*	4,7	6255
		2240_2254del15	7,2	12369
		2240_2257del18	13,4**	12370
		2239_2248>C	2,2	12382
		2237_2255>T*	4,1	12384
		2237_2253>TTGCT*	6,3	12416
		2238_2252del15	2,4	23571
		2238_2252del15*	5,5	23571
		2239_2257>GT*	6,0	Δεν βρέθηκε
20	T790M	2369 C>T	2,0	6240
		2369 C>T	2,4	6240
		2369 C>T	3,0	6240
	S768I	2303 G>T	1,3	6241
		2303 G>T	2,4	6241
	Ένθεση στο Εξώνιο 20	2307_2308insGCCAGCGTG	1,7	12376
		2319_2320insCAC	6,8	12377
		2310_2311insGGT	1,3	12378
21	L858RP	2573 T>G	4,0	6224
		2573 T>G	4,2	6224
		2573 T>G	4,3	6224
		2573 T>G	4,3	6224
		2573 T>G	5,3	6224
	L861Q	2582T>A	2,1	6213
		2582T>A	2,2	6213
		2582T>A	3,4	6213

* Για αυτές τις δευτερεύουσες μεταλλάξεις ελλείψεων στο εξώνιο 19 που παρατηρήθηκαν στη δοκιμή EURLAC, έγινε εξέταση μόνο για στοχευόμενα επίπεδα μετάλλαξης περίπου 5%. Μίγματα DNA δειγμάτων εξετάστηκαν σε 3 κέντρα μελέτης.

** Το όριο ανίχνευσης του **cobas** EGFR Test για αυτήν τη μετάλλαξη είναι μεγαλύτερη από επίπεδο μετάλλαξης 10% όταν χρησιμοποιείται η τυπική ποσότητα εισαγωγής 50 ng ανά βύθισμα αντίδρασης.

Η μελέτη αυτή καταδεικνύει ότι το **cobas** EGFR Test μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις στα εξώνια EGFR 18, 19, 20 και 21 με επίπεδο μετάλλαξης τουλάχιστον 5% όταν χρησιμοποιείται η τυπική ποσότητα εισαγωγής 50 ng ανά βύθισμα αντίδρασης.

Ελάχιστη περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό

Εξετάστηκαν συνολικά 66 ανεξάρτητα δείγματα με μετάλλαξη EGFR (δηλαδή 35 μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 και 31 μεταλλάξεις L858R στο εξόνιο 21) με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό από 25% έως 99% προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό που απαιτείται για την ανίχνευση της μετάλλαξης του EGFR σε δείγματα NSCLC. Κανένα από τα δείγματα που αξιολογήθηκαν δεν έφερε και μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19 και μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21. Κάθε δείγμα εξετάστηκε χωρίς μακροεκτομή (ακέραιο) και μετά από μακροεκτομή. Οι παρατηρηθείσες τιμές CtR για τις ακέραιες τομές και τις τομές που υποβλήθηκαν σε μακροεκτομή αναλύθηκαν με τη χρήση της παλινδρόμησης κατά Deming και του γραφήματος Bland-Altman (διαφορές έναντι μέσης τιμής). Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη χρήση δειγμάτων των οποίων η περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό είναι μεγαλύτερη από 25% χωρίς μακροεκτομή.

Εξετάστηκαν επιπλέον 10 δείγματα NSCLC EGFR άγριου τύπου (wild-type) (1–90% περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό) και 10 δείγματα με μετάλλαξη EGFR (8–95% περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό) προκειμένου να προσδιοριστεί κατά πόσο η μακροεκτομή ιστού όγκου NSCLC χαμηλής περιεκτικότητας θα βελτιώνει την ανιχνευσιμότητα του **cobas** EGFR Test. Κάθε δείγμα εξετάστηκε χωρίς μακροεκτομή (ακέραιο) και μετά από μακροεκτομή. Όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από μακροεκτομή αντιστοιχούσαν με όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν χωρίς μακροεκτομή, ενώ παρατηρήθηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα μετάλλαξης και άγριου τύπου (wild-type) και για τα 20 δείγματα.

Στη δοκιμή φάσης III EORTC, στην οποία συγκρίθηκε η ερλοτινίμη έναντι της χημειοθεραπείας με σισπλατίνη, δείγματα FFPE NSCLC με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό μικρότερη από 10% υποβλήθηκαν σε μακροεκτομή πριν από την ανάλυση μετάλλαξης EGFR. Ένα υποσύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων EORTC αξιολογήθηκε ως προς την κατάσταση μετάλλαξης του EGFR τόσο με χρήση του **cobas** EGFR Test όσο και με χρήση των μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Ο Πίνακας 7 και ο Πίνακας 8 περιλαμβάνουν δείγματα NSCLC με έγκυρα αποτελέσματα κατά ζεύγη για μεταλλάξεις EGFR στο εξόνιο 19 ή μεταλλάξεις L858R, συνδυασμένα τόσο από το **cobas** EGFR Test όσο και από την αλληλούχιση NGS. Όταν χρησιμοποιήθηκε η NGS ως μέθοδος αναφοράς, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μακροεκτομή τομών FFPE NSCLC με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό μικρότερη από 10%, κατέδειξε αναλυτική ακρίβεια συγκρίσιμη με αυτή της τομής FFPE NSCLC η οποία δεν είχε υποβληθεί σε μακροεκτομή.

Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν ότι απαιτείται μακροεκτομή για τομές FFPE NSCLC με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό μικρότερη από 10%, πριν την εξέταση με το **cobas** EGFR Test.

Πίνακας 7 Απόδοση του cobas EGFR Test για δείγματα FFPE NSCLC με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό ≤ 10% (υποβληθέντα σε μακροεκτομή)

Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	97,2% (35/36)	85,8%, 99,5%
Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	94,5% (52/55)	85,1%, 98,1%
Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	95,6% (87/91)	89,2%, 98,3%

Πίνακας 8 Απόδοση του cobas EGFR Test για δείγματα FFPE NSCLC με περιεκτικότητα σε καρκινικό ιστό > 10% (μη υποβληθέντα σε μακροεκτομή)

Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	93,0% (107/115)	86,9%, 96,4%
Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	98,5% (199/202)	95,7%, 99,5%
Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	96,5% (306/317)	93,9%, 98,1%

Διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες μεταλλάξεις των εξωνίων 18, 19, 20 και 21

Δείγματα της κλινικής δοκιμής EURLAC

Το **cobas** EGFR Test έδωσε αποτελέσματα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») για τις παρακάτω μεταλλάξεις του EGFR που παρατηρήθηκαν στα δείγματα της κλινικής δοκιμής EURLAC (Πίνακας 9). Η απόδοση ανάλυσης του **cobas** EGFR Test στην ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει αξιολογηθεί.

Πίνακας 9 Μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν στη δοκιμή της EURLAC και εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με το **cobas** EGFR Test

Εξώνιο	Αλληλουχία μετάλλαξης	Αλλαγή Αμινοξέος	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Δεν βρέθηκε
	2236_2244del9	E746_R748>E	Δεν βρέθηκε
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Δεν βρέθηκε
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Δεν βρέθηκε

Δείγματα της κλινικής δοκιμής AURA2

Το **cobas** EGFR Test έδωσε ένα αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») για την παρακάτω μετάλλαξη του EGFR που παρατηρήθηκε στα δείγματα της κλινικής δοκιμής AURA2 (Πίνακας 10). Η απόδοση ανάλυσης του **cobas** EGFR Test στην ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης δεν έχει αξιολογηθεί.

Πίνακας 10 Μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν στη δοκιμή AURA2 και εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με το **cobas** EGFR Test

Εξώνιο	Αλληλουχία μετάλλαξης	Αλλαγή Αμινοξέος	COSMIC ID ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Ειδικότητα — Μικροοργανισμοί και ομόλογα EGFR

Η ειδικότητα του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε μέσω εξέτασης μικροοργανισμών που σχετίζονται με τους πνεύμονες και πλασμιδίων των ομολόγων του EGFR, δηλ. πλασμιδίων που περιέχουν τις αλληλουχίες καθεμίας εκ των γενετικών περιοχών HER2, HER3 και HER4 και είναι ανάλογες των αλληλουχιών των εξωνίων 18, 19, 20 και 21 του EGFR που ενισχύονται από το **cobas** EGFR Test.

Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τους πνεύμονες

Για τα *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae* σε μονάδες σχηματισμού αποικιών 4×10^5 , βρέθηκε ότι δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση ή αλληλεπίδραση με το **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης τους σε δείγματα που περιείχαν άγριου τύπου (wild-type) και μεταλλαγμένες αλληλουχίες EGFR κατά τη διάρκεια του σταδίου λύσης ιστού.

Πλασμίδια ομολόγων EGFR

Διαπιστώθηκε ότι αλληλουχίες δομικώς συγγενών αναλόγων πρωτεϊνών του επιδερμικού υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης (EGFR/HER1, HER2, HER3 και HER4) δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με το **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης της δυνητικά αντιδρώσας αλληλουχίας, σε αριθμό αντιγράφων γονιδιωματικής αλληλουχίας ισοδύναμο με 50 ng/εισαγωγή PCR, στην απομονωμένη ποσότητα αρχικού DNA πριν από τη διαδικασία ενίσχυσης/ανίχνευσης. Συμπεριλήφθηκε και μια εξέταση ελέγχου χωρίς πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι

παρατηρηθείσες μεταλλάξεις και για τα 15 δείγματα FFPET που εξετάστηκαν ταυτίζονταν με την αναμενόμενη μετάλλαξη, όπως αυτή είχε προσδιοριστεί μέσω αλληλούχησης, τόσο παρουσία όσο και απουσία προσθήκης πλασμιδιακού DNA με γονίδιο HER. Επιπλέον, δοκιμάστηκε η διασταυρούμενη αντίδραση με τη μετάλλαξη L747S του εξωνίου 19 του EGFR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το **cobas** EGFR Test παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με τη μετάλλαξη L747S του εξωνίου 19 του EGFR.

Αλληλεπίδραση

Αποδείχθηκε ότι τα τριγλυκερίδια (37 mM, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹) και η αιμοσφαιρίνη (2 mg/mL, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹) δεν αλληλεπιδρούν με το **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης της δυνητικά παρεμβαλλόμενης ουσίας στο στάδιο της λύσης, κατά τη διαδικασία προετοιμασίας δείγματος.

Η αλβουτερόλη (Ventolin), το ιπρατρόπιο (Atrovent), η φλουνικαζόνη (Flonase), η κεφταζιδίμη (Fortaz), η ιμιπενέμη-σιλαστατίνη (Primaxin), η πιπερακιλλίνη-ταζομοπακτάμη, η σιλαστίνη (νατριούχος σιλαστατίνη), η βεταδίνη (Betadine) και η λιδοκαΐνη βρέθηκαν να μην αλληλεπιδρούν με την απόδοση του **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης τους στο στάδιο της λύσης, κατά τη διαδικασία προετοιμασίας δείγματος.

Νεκρωτικός ιστός

Τα δείγματα FFPET για NSCLC με περιεχόμενο νεκρωτικού ιστού έως 60% σε δείγματα μετάλλαξης EGFR και 85% σε δείγματα άγριου τύπου (wild-type) έδειξαν ότι δεν αλληλεπιδρούν με τα αποτελέσματα εντοπισμού μεταλλάξεων που προκύπτουν από το **cobas** EGFR Test.

Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε με βάση έξι δείγματα FFPET, συμπεριλαμβανομένων δύο δειγμάτων άγριου τύπου (wild-type) EGFR, τεσσάρων δειγμάτων μετάλλαξης EGFR, ενός για καθένα από τα ακόλουθα: έλλειψη στο εξόνιο 19, S768I και G719X, T790M και L858R, και μεταλλάξεις ένθεσης στο εξόνιο 20. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν εις διπλούν από δύο χειριστές, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων και δύο αναλυτές **cobas**® z 480 στη διάρκεια τεσσάρων ημερών. Συνολικά αξιολογήθηκαν 32 αντίγραφα ανά δείγμα. Το **cobas** EGFR Test παρουσίασε ποσοστό σωστού εντοπισμού μεταλλάξεων 96,9% (186/192).

Επίσης, η επαναληψιμότητα του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε σε μια δεύτερη μελέτη με τη χρήση τεσσάρων δειγμάτων FFPET, συμπεριλαμβανομένων ενός δείγματος άγριου τύπου (wild-type) EGFR και τριών δειγμάτων FFPET μετάλλαξης EGFR, ενός για καθένα από τα ακόλουθα: L861Q, G719X και μεταλλάξεις ένθεσης στο εξόνιο 20. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις διπλούν από δύο χειριστές, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων και δύο αναλυτές **cobas**® z 480 στη διάρκεια πολλών ημερών. Το **cobas** EGFR Test είχε ποσοστό ακρίβειας σωστού εντοπισμού μεταλλάξεων 99,2% (127/128) σε όλα τα αντίγραφα δειγμάτων, με όλους τους χειριστές, τις παρτίδες αντιδραστηρίων και τα όργανα.

Επαναληψιμότητα του χειρισμού δειγμάτων

Η επαναληψιμότητα του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® εξετάστηκε με τη χρήση τομών προερχόμενων από τρία ιστοτεμάχια FFPET, ένα δείγμα που περιείχε μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19, ένα που περιείχε μετάλλαξη L858R και ένα δείγμα άγριου τύπου (wild-type). Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν σε κάθε κέντρο και κάθε ημέρα. Οι τομές ενός ορισμένου δείγματος τυχαιοποιήθηκαν και εξετάστηκαν επί μια περίοδο έξι ημερών σε τρία κέντρα, από έναν χειριστή σε κάθε κέντρο, έναν αναλυτή **cobas**® z 480 σε κάθε κέντρο, τρεις παρτίδες κιτ προετοιμασίας δειγμάτων DNA **cobas**® και μία παρτίδα κιτ **cobas** EGFR Test. Κάθε ημέρα εξέτασης, ο κάθε χειριστής απομόνωσε και εξέτασε το DNA από δύο λεπτές τομές για κάθε δείγμα FFPET NSCLC, με χρήση του **cobas** EGFR Test. Όλα τα δείγματα έδωσαν έγκυρα και ορθά αποτελέσματα καθ' όλη τη διάρκεια των έξι ημερών εξέτασης. Για όλα τα δείγματα και για όλους τους χειριστές συγκεντρωτικά, το **cobas** EGFR Test παρουσίασε ποσοστό σωστού εντοπισμού μεταλλάξεων 100% (108/108).

Αξιολόγηση της κλινικής απόδοσης

Κλινική μελέτη επαναληψιμότητας 1

Διεξήχθη μια εξωτερική μελέτη για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας του **cobas** EGFR Test σε 3 εξωτερικά κέντρα εξέτασης (2 χειριστές ανά κέντρο), με 3 παρτίδες αντιδραστηρίων, σε 5 μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης, με έναν πίνακα 13 στοιχείων, με δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τομές FFPE από δείγματα όγκων NSCLC άγριου τύπου (WT) και μεταλλαγμένου τύπου (MT). Ο πίνακας αυτός περιλάμβανε τη μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21 και πέντε διαφορετικές μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19. Από τις 92 αναλύσεις, οι 90 (97,8%) ήταν έγκυρες. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 2.340 εξετάσεις στα 13 στοιχεία πίνακα σε 90 έγκυρες σειρές αναλύσεων. Τα αποτελέσματα όλων των εξετάσεων ήταν έγκυρα. Δεν υπήρχαν αποτελέσματα «Mutation Detected» σε 180 έγκυρες εξετάσεις των στοιχείων WT του πίνακα, δίνοντας συμφωνία σε ποσοστό 100%. Η συμφωνία ήταν 100% για τα 10 από τα 12 στοιχεία του πίνακα MT. Για το στοιχείο EX19_2240_2257del18 – μετάλλαξη 5%, η συμφωνία ήταν 62,8% (τα 67 από τα 180 αποτελέσματα εξέτασης ήταν «No Mutation Detected»). Για το στοιχείο EX19_2240_2257del18 – μετάλλαξη 10%, η συμφωνία ήταν 99,4% (το 1 από τα 180 αποτελέσματα εξέτασης ήταν «No Mutation Detected»). Ο Πίνακας 11 παρουσιάζει τα αποτελέσματα ως προς τη συνολική συμφωνία. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) ήταν < 6% για όλα τα στοιχεία του πίνακα μεταλλάξεων. Για κάθε ένα στοιχείο του πίνακα, ο CV ήταν < 3,5%. Για τον εξωτερικό ορό έλεγχο, ο συνολικός CV ήταν < 1,3%. Ο CV% ήταν < 0,5% μεταξύ παρτίδων και < 1,2% εντός της ίδιας παρτίδας.

Πίνακας 11 Εκτιμήσεις συνολικής συμφωνίας ανά στοιχείο πίνακα στη μελέτη επαναληψιμότητας 1 του cobas EGFR Test

Στοιχείο πίνακα	Αριθμός έγκυρων εξετάσεων	Συμφωνία (N)	Ποσοστό συμφωνίας (95% CI) ^a
Άγριου τύπου	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – μετάλλαξη 5%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 – μετάλλαξη ≤ 10%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – μετάλλαξη 5%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 – μετάλλαξη ≤ 10%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – μετάλλαξη 5%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C – μετάλλαξη ≤ 10%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – μετάλλαξη 5%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 – μετάλλαξη ≤ 10%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 – μετάλλαξη 5%	180	113	62,8 (55,3, 69,9)*
EX19_2240_2257del18 – μετάλλαξη ≤ 10%	180	179	99,4 (96,9, 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R – μετάλλαξη 5%	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R – μετάλλαξη ≤ 10%	180	180	100 (98,0, 100,0)

Σημείωση: Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία όταν ένα στοιχείο μεταλλαγμένου τύπου (MT) του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») ή όταν ένα στοιχείο άγριου τύπου (WT) του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μεταλλάξεων («No Mutation Detected»).

^a 95% CI = 95% ακριβές διωνυμικό διάστημα εμπιστοσύνης.

* Η αναλυτική ευαισθησία του **cobas** EGFR Test για την ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο μετάλλαξης 10% όταν χρησιμοποιείται η τυπική ποσότητα εισαγωγής 50 ng ανά βύθισμα αντίδρασης.

Κλινική μελέτη επαναληψιμότητας 2

Πραγματοποιήθηκε μια εξωτερική μελέτη για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας του **cobas** EGFR Test σε 3 κέντρα εξέτασης (2 εξωτερικά και 1 εσωτερικό, 2 χειριστές ανά κέντρο), 3 παρτίδες αντιδραστηρίων και 5 μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης, με έναν πίνακα 11 στοιχείων με δείγματα DNA που απομονώθηκαν από τομές FFPE δειγμάτων όγκων NSCLC άγριου τύπου (WT) και μεταλλαγμένου τύπου (MT). Ο πίνακας αυτός περιλάμβανε τη μετάλλαξη G719X στο εξόνιο 18, τη μετάλλαξη T790M στο εξόνιο 20, τη μετάλλαξη S768I στο εξόνιο 20, τη μετάλλαξη ένθεσης στο εξόνιο 20 και τη μετάλλαξη L861Q στο εξόνιο 21. Από τις 91 αναλύσεις, οι 90 (98,9%) ήταν έγκυρες. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 1.980 εξετάσεις με 11 στοιχεία πίνακα που εξετάστηκαν εις διπλούν σε 90 έγκυρες αναλύσεις. Τα αποτελέσματα όλων των εξετάσεων ήταν έγκυρα. Δεν υπήρχαν αποτελέσματα «Mutation Detected» σε 180 έγκυρες εξετάσεις των στοιχείων WT του πίνακα, δίνοντας συμφωνία σε ποσοστό 100%. Τα ποσοστά συμφωνίας ήταν 100% για όλα τα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα, με εξαίρεση το στοιχείο της ένθεσης στο εξόνιο 20 του πίνακα LoD. Ο Πίνακας 12 παρουσιάζει τα αποτελέσματα ως προς τη συνολική συμφωνία. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) ήταν < 9,2% για όλα τα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα. Για τον εξωτερικό ορό ελέγχου, ο συνολικός CV ήταν ≤ 1,3%. Ο CV ήταν ≤ 0,6% μεταξύ παρτίδων και ≤ 1,1% εντός της ίδιας παρτίδας.

Πίνακας 12 Εκτιμήσεις συνολικής συμφωνίας ανά στοιχείο πίνακα στη μελέτη επαναληψιμότητας 2 του **cobas** EGFR Test

Στοιχείο πίνακα	Αριθμός έγκυρων εξετάσεων	Συμφωνία (N)	Ποσοστό συμφωνίας (95% CI)*
Άγριου τύπου	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 18, G719X – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 20, T790M – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 20, S768I – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ένθεση στο εξόνιο 20 – LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
Εξόνιο 21, L861Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 18, G719X – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 20, T790M – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 20, S768I – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ένθεση στο εξόνιο 20 – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Εξόνιο 21, L861Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Σημείωση: Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία όταν ένα στοιχείο μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης για τη μετάλλαξη-στόχο ή όταν ένα στοιχείο άγριου τύπου του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα NMD.

* 95% CI = 95% ακριβές διωνυμικό διάστημα εμπιστοσύνης.

CI = διάστημα εμπιστοσύνης, LoD = όριο ανίχνευσης, NMD = δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη

Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης III από τη δοκιμή EURTAC

Η κλινική απόδοση του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης με δύο μεθόδους αναφοράς —τη $2 \times$ αμφίδρομη αλληλούχιση Sanger και την ποσοτική αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)— με χρήση 487 δειγμάτων όγκων πνεύμονα μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη, από ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε εξέταση διαλογής κατά τη δοκιμή φάσης III EURTAC, όπου συγκρίθηκε η θεραπεία με TARCEVA® (ερλοτινίμη) έναντι της χημειοθεραπείας με σισπλατίνη.^{6, 22} Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών των οποίων τα δείγματα ήταν διαθέσιμα για αυτήν την αναδρομική εξέταση ήταν συγκρίσιμα με τα χαρακτηριστικά των κατά τα άλλα κατάλληλων ασθενών (557) για τους οποίους δεν υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα.

Στη δοκιμή EURTAC εξετάστηκαν συνολικά 1.276 ασθενείς με χρήση ενός συνδυασμού εξετάσεων που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο, οι οποίες ονομάζονταν συνολικά «μέθοδος κλινικής δοκιμής» (CTA). Αφού αποκλείστηκαν οι ακατάλληλοι ασθενείς και οι ασθενείς χωρίς αποτελέσματα CTA, 1.044 ασθενείς θεωρήθηκαν δυνητικά κατάλληλοι για αυτήν τη μελέτη. Από τους 1.044 κατάλληλους ασθενείς, οι 225 είχαν δείγματα θετικά για μετάλλαξη βάσει της CTA, οι 792 είχαν δείγματα άγριου τύπου (WT) βάσει της CTA, και οι 27 είχαν δείγματα με ασαφή αποτελέσματα βάσει της CTA. Από τους 1.044 δυνητικά κατάλληλους ασθενείς, 487 δείγματα ήταν διαθέσιμα για επανεξέταση με το **cobas** EGFR Test.

Και τα 487 δείγματα εξετάστηκαν με τυφλό τρόπο, τόσο με το **cobas** EGFR Test όσο και με την αλληλούχιση Sanger. Από αυτά, τα 406 έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα με το **cobas** EGFR Test και την αλληλούχιση Sanger, ενώ παρατηρήθηκαν 38 άκυρα αποτελέσματα με το **cobas** EGFR Test και την αλληλούχιση Sanger, 38 άκυρα αποτελέσματα μόνο με την αλληλούχιση Sanger και 5 άκυρα αποτελέσματα μόνο με το **cobas** EGFR Test. Από τα 487 δείγματα που ήταν διαθέσιμα για επανεξέταση με το **cobas** EGFR Test, τα 444 έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα με το **cobas** EGFR Test, ενώ εξετάστηκαν και με τη μέθοδο NGS. Από αυτά, ελήφθησαν 36 άκυρα αποτελέσματα κατά την ανάλυση NGS και, συνεπώς, 408 δείγματα έδωσαν έγκυρο αποτέλεσμα με το **cobas** EGFR Test και τη μέθοδο NGS. Η αναλυτική ορθότητα του **cobas** EGFR Test σε σύγκριση με καθεμία από τις μεθόδους αναφοράς αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της ποσοστιαίας συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων (PPA), της ποσοστιαίας συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA) και της συνολικής ποσοστιαίας συμφωνίας (OPA), μαζί με τα αντίστοιχα διαστήματα 95% CI, για τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 και τις μεταλλάξεις L858R, τόσο συγκεντρωτικά όσο και χωριστά.

Στη δοκιμή EURTAC, το **cobas** EGFR Test ανίχνευσε μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 και στο εξόνιο 21 του γονιδίου EGFR. Ο Πίνακας 13 παραθέτει αυτές τις μεταλλάξεις. Από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στη δοκιμή EURTAC, διαπιστώθηκε αναλυτική ευαισθησία για τις μεταλλάξεις που αναφέρει ο Πίνακας 6.

Πίνακας 13 Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν από το cobas EGFR Test στη δοκιμή EURLAC

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

Στην ανάλυση συμφωνίας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 406 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα που προέκυψαν από το cobas EGFR Test και τη μέθοδο Sanger. Η τιμή PPA μεταξύ του cobas EGFR Test και της αλληλούχισης Sanger ήταν 96,6% (95% CI: 91,5% έως 98,7%) και η τιμή NPA ήταν 88,3% (95% CI: 84,1% έως 91,5%), για την ανίχνευση των ελλείψεων στο εξώνιο 19 και των μεταλλάξεων L858R συγκεντρωτικά, όπως δείχνει ο Πίνακας 14. Η τιμή OPA ήταν 90,6%, με το κατώτατο όριο του διαστήματος 95% CI να είναι πάνω από το 87%. Οι τιμές PPA, NPA και OPA για την ανίχνευση των μεταλλάξεων έλλειψης στο εξώνιο 19 ήταν όλες > 92%. Οι τιμές PPA, NPA και OPA για την ανίχνευση των μεταλλάξεων L858R ήταν όλες > 95%.

Πίνακας 14 Σύγκριση του cobas EGFR Test με τη μέθοδο αλληλούχισης Sanger για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξώνιο 19 του EGFR και της μετάλλαξης L858R

Μετάλλαξη	Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Έλλειψη στο Εξώνιο 19	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	97,3% (71/73)	90,5%, 99,2%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	92,5% (308/333)	89,2%, 94,9%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	93,3% (379/406)	90,5%, 95,4%
L858R	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	95,3% (41/43)	84,5%, 98,7%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	97,5% (354/363)	95,4%, 98,7%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	97,3% (395/406)	95,2%, 98,5%
Συγκεντρωτικά	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	96,6% (112/116)	91,5%, 98,7%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	88,3% (256/290)	84,1%, 91,5%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	90,6% (368/406)	87,4%, 93,1%

Στην ανάλυση συμφωνίας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 408 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα που προέκυψαν από το **cobas** EGFR Test και τη μέθοδο NGS. Βάσει σύγκρισης, οι τιμές PPA και NPA μεταξύ του **cobas** EGFR Test και της μεθόδου NGS για την ανίχνευση των ελλείψεων στο εξόνιο 19 και της σημειακής μετάλλαξης L858R συγκεντρωτικά ήταν 94,0% (95% CI: 89,1% έως 96,8%) και 97,7% (95% CI: 95,0% έως 98,9%) αντίστοιχα, όπως δείχνει ο Πίνακας 15. Η τιμή OPA ήταν 96,3%, με κατώτατο όριο διαστήματος 95% CI ίσο με 94,0%. Οι τιμές PPA, NPA και OPA για την ανίχνευση των μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 ήταν όλες > 95%, ενώ όλα τα κατώτατα όρια των 95% CI ήταν > 90%. Οι τιμές PPA, NPA και OPA για την ανίχνευση της μετάλλαξης L858R ήταν επίσης όλες > 95% και όλα τα κατώτατα όρια των 95% CI ήταν ≥ 95%, εκτός από την PPA (90%), λόγω του μικρού αριθμού μεταλλάξεων L858R που εντοπίστηκαν.

Πίνακας 15 Σύγκριση του cobas EGFR Test με τη μέθοδο NGS για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R του EGFR

Μετάλλαξη	Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Έλλειψη στο Εξόνιο 19	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	95,9% (94/98)	90,0%, 98,4%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	99,7% (309/310)	98,2%, 99,9%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	98,8% (403/408)	97,2%, 99,5%
L858R	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	90,6% (48/53)	79,7%, 95,9%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	98,6% (350/355)	96,7%, 99,4%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	97,5% (398/408)	95,5%, 98,7%
Συγκεντρωτικά	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	94,0% (142/151)	89,1%, 96,8%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	97,7% (251/257)	95,0%, 98,9%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	96,3% (393/408)	94,0%, 97,8%

Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2

Η κλινική απόδοση του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης με μια επικυρωμένη πλατφόρμα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), με χρήση 383 δειγμάτων όγκων πνεύμονα μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη, από ασθενείς με προχωρημένο NSCLC οι οποίοι είχαν εξεταστεί με χρήση του **cobas** EGFR Test στη δοκιμή φάσης II AURA2 για το TAGRISSO® (οσιμερτινίμη).

Συνολικά 472 ασθενείς εξετάστηκαν για τη δοκιμή AURA2 με χρήση του **cobas** EGFR Test. Αφού αποκλείστηκαν οι ακατάλληλοι ασθενείς, 383 ασθενείς αποδείχθηκαν κατάλληλοι για αυτήν τη μελέτη.

Και τα 383 δείγματα εξετάστηκαν με τυφλό τρόπο, τόσο με το **cobas** EGFR Test όσο και με μια επικυρωμένη μέθοδο NGS. Από αυτά, 368 δείγματα έδωσαν έγκυρο αποτέλεσμα τόσο με το **cobas** EGFR Test όσο και με τη μέθοδο NGS. Συνολικά 2 μη έγκυρα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο με το **cobas** EGFR Test όσο και με τη μέθοδο NGS, 2 μη έγκυρα αποτελέσματα μόνο με τη μέθοδο NGS και 11 έγκυρα αποτελέσματα μόνο με το **cobas** EGFR Test. Η αναλυτική ορθότητα του **cobas** EGFR Test σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς, την NGS, για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό της ποσοστιαίας συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων (PPA), της ποσοστιαίας συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA) και της συνολικής ποσοστιαίας συμφωνίας (OPA), μαζί με τα αντίστοιχα 95% CI, για τη μετάλλαξη T790M.

Στη δοκιμή AURA2, το **cobas** EGFR Test ανίχνευσε τις μεταλλάξεις του γονιδίου EGFR. Ο Πίνακας 16 παραθέτει αυτές τις μεταλλάξεις. Από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στη δοκιμή AURA2, διαπιστώθηκε αναλυτική ευαισθησία για τις μεταλλάξεις που αναφέρει ο Πίνακας 6.

Πίνακας 16 Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν από το cobas EGFR Test στη δοκιμή AURA2

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

Στην ανάλυση συμφωνίας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 368 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα που προέκυψαν από το **cobas** EGFR Test και τη μέθοδο NGS. Η τιμή PPA μεταξύ του **cobas** EGFR Test και της μεθόδου NGS ήταν 88,3% (95% CI: 83,8% έως 91,7%), η τιμή NPA ήταν 97,3% (95% CI: 92,4% έως 99,1%) και η τιμή OPA ήταν 91,0% (95% CI: 87,7% έως 93,5%) για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M, όπως δείχνει ο Πίνακας 17. Τριάντα δείγματα ήταν θετικά βάσει της μεθόδου NGS αλλά αρνητικά βάσει του **cobas** EGFR Test: σε 10/30 δείγματα, το ποσοστό της μετάλλαξης T790M που καθορίστηκε μέσω της NGS ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (LoD) (< 2% μετάλλαξη) του **cobas** EGFR Test. Σε 20/30 δείγματα, μια μετρίως όψιμη τιμή Ct IC κατέδειξε χαμηλή δυνατότητα ενίσχυσης του προτύπου DNA.

Πίνακας 17 Σύγκριση του cobas EGFR Test με τη μέθοδο NGS για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M του EGFR

Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	88,3% (226/256)	83,8%, 91,7%
Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	97,3% (109/112)	92,4%, 99,1%
Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	91,0% (335/368)	87,7%, 93,5%

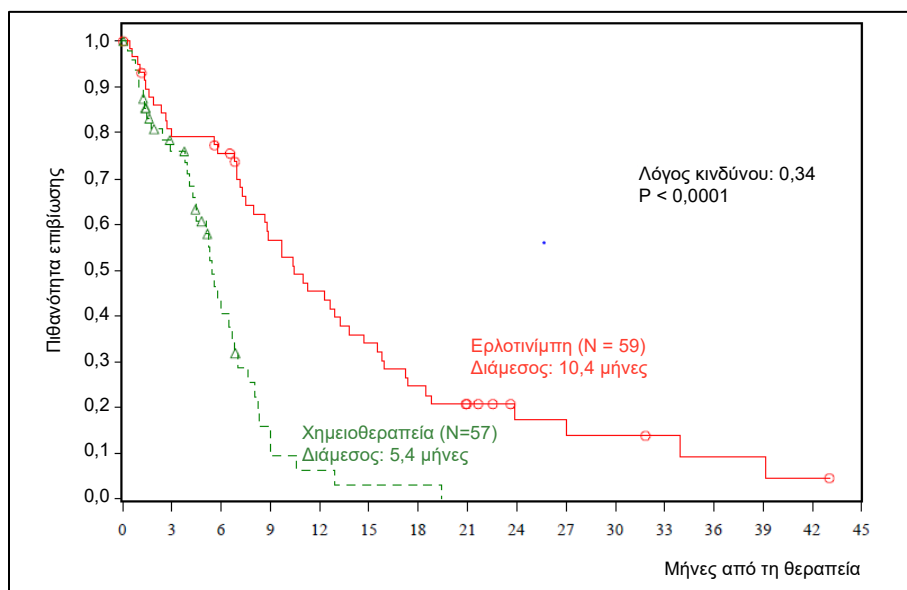
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων

EURTAC

Η δοκιμή EURTAC²² ήταν μια πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, ανοικτής θεραπείας, που συνέκρινε το TARCEVA® (ερλοτινίμη) με τη συνήθη χημειοθεραπεία δύο παραγόντων με βάση την πλατίνα ως θεραπεία πρώτης γραμμής, σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC οι οποίοι δεν είχαν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία και των οποίων οι όγκοι έφεραν ελλείψεις στο εξόνιο 19 ή μετάλλαξη αντικατάστασης στο εξόνιο 21 (L858R) του EGFR, όπως αυτές προσδιορίστηκαν μέσω μιας δοκιμασίας κλινικής δοκιμής (CTA). Η μελέτη διεξήχθη με χορηγία της Ισπανικής Ομάδας Καρκίνου του Πνεύμονα (SLCG). Στη μελέτη εγγράφηκαν συνολικά 174 ασθενείς. Τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν TARCEVA® παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) (διάμεση PFS 10,4 μήνες έναντι 5,1 μηνών) σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία, με λόγο κινδύνου 0,34 ($p < 0,0001$, 95% CI [0,23 έως 0,49]). Το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών στο σκέλος του TARCEVA® ήταν υψηλότερο από το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών που έλαβαν χημειοθεραπεία (65,1% έναντι 16,1%). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση (OS) μεταξύ των δύο σκελών, καθώς το 76% των ασθενών στο σκέλος της τυπικής χημειοθεραπείας μεταφέρθηκε σε αγωγή με TARCEVA®.

Από τους 174 ασθενείς που εγγράφηκαν στη δοκιμή EURTAC, τα 134 περιστατικά (77% του πληθυσμού της μελέτης, μεταξύ των οποίων 69 ασθενείς από το σκέλος του TARCEVA® και 65 ασθενείς από το σκέλος της χημειοθεραπείας) ήταν διαθέσιμοι για επανεξέταση και εξετάστηκαν αναδρομικά με το **cobas** EGFR Test. Από τα 134 περιστατικά που επανεξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test, τα 116 (59 ασθενείς από το σκέλος του TARCEVA® και 57 ασθενείς από το σκέλος της χημειοθεραπείας) έδωσαν αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») με το **cobas** EGFR Test. Η ανάλυση του υποσυνόλου των 116 έδειξε ότι οι ασθενείς που είχαν λάβει TARCEVA® σημείωσαν σημαντική αύξηση στον χρόνο PFS (διάμεση PFS 10,4 έναντι 5,4 μηνών) και είχαν μικρότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν συμβάν εξέλιξης της νόσου ή να αποβιώσουν (λόγος κινδύνου = 0,34, 95% CI [0,21 έως 0,54], $p < 0,0001$) από ό,τι οι ασθενείς που είχαν λάβει χημειοθεραπεία (Σχήμα 3). Το ποσοστό ανταπόκρισης στο σκέλος του TARCEVA® ήταν υψηλότερο από ό,τι στο σκέλος της χημειοθεραπείας (59,3% έναντι 14,0%). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην OS μεταξύ των δύο ομάδων. Το παρατηρηθέν κλινικό όφελος στο υποσύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test ήταν συγκρίσιμο με αυτό που παρατηρήθηκε στον πλήρη πληθυσμό της μελέτης (Πίνακας 18).

Διεξήχθη μια πρόσθετη ανάλυση αποτελεσματικότητας ώστε να ληφθούν υπόψη οι ασθενείς που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στο **cobas** EGFR Test αλλά αρνητικό ή μη έγκυρο αποτέλεσμα στη CTA. Στο σενάριο χειρότερης περίπτωσης (στο οποίο θεωρήθηκε ότι ο λόγος κινδύνου ήταν 1 για τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στο **cobas** EGFR Test και αρνητικό στη CTA), τα δεδομένα έδωσαν λόγο κινδύνου ίσο με 0,42 (95% CI [0,26, 0,57]).

Σχήμα 3 Διάγραμμα Kaplan-Meier της PFS κατά θεραπεία, για τους ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε μετάλλαξη μέσω του cobas EGFR Test (αξιολόγηση ερευνητή)**Πίνακας 18** Το κλινικό όφελος για τους ασθενείς που εξετάστηκαν με το cobas EGFR Test είναι συγκρίσιμο με αυτό που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της δοκιμής EURTAC

Παράμετρος	Θετικός πληθυσμός cobas EGFR Test n = 116		EURTAC n = 173*	
	Χημειοθεραπεία n = 57	Ερλοτινίνη n = 59	Χημειοθεραπεία n = 87	Ερλοτινίνη n = 86
PFS				
Διάμεσος (μήνες)	5,4	10,4	5,1	10,4
Λόγος κινδύνου	0,34		0,34	
95% CI του λόγου κινδύνου	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
Τιμή P (έλεγχος log-rank)	< 0,0001		< 0,0001	

* Ένας ασθενής απέσυρε τη συγκατάθεσή του μετά την ολοκλήρωση της μελέτης EURTAC και, συνεπώς, προέκυψε σύνολο δεδομένων n = 173.

AURA2

Η δοκιμή AURA2²³ ήταν μια πολυκεντρική, φάσης II, ανοικτής θεραπείας, ενός σκέλους μελέτη, η οποία αξιολόγησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του TAGRISSO® (οσιμερτινίνη) ως θεραπείας δεύτερης ή ≥ τρίτης γραμμής, σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC οι οποίοι είχαν εμφανίσει εξέλιξη της νόσου μετά από προηγούμενη θεραπεία με εγκεκριμένο παράγοντα EGFR TKI. Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να έχουν NSCLC θετικό στη μετάλλαξη T790M βάσει του cobas EGFR Test. Η κύρια παράμετρος έκβασης της αποτελεσματικότητας ήταν το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) κατά RECIST 1.1, όπως αξιολογήθηκε μέσω τυφλής ανεξάρτητης κεντρικής ανασκόπησης (BICR) με χρήση του συνόλου ανάλυσης ασθενών αξιολογήσιμων για ανταπόκριση (ERAS). Το ORR ορίστηκε ως ο αριθμός (%) ασθενών που είχαν τουλάχιστον μία επίσκεψη και αποτέλεσμα πλήρους ανταπόκρισης (CR) ή μερικής ανταπόκρισης (PR) το οποίο επιβεβαιώθηκε τουλάχιστον 4 εβδομάδες αργότερα (δηλ., ως βέλτιστη αντικειμενική ανταπόκριση [BOR] είχαν CR ή PR).

Από τους 472 ασθενείς που εξετάστηκαν για τη δοκιμή AURA2, 383 ασθενείς ήταν κατάλληλοι για εξέταση με το **cobas** EGFR Test. Από αυτούς που ήταν κατάλληλοι, 233 T790M+ ασθενείς εισήχθησαν στη δοκιμή AURA2 και 210 ασθενείς εντάχθηκαν και έλαβαν TAGRISSO® (πλήρες σύνολο ανάλυσης [FAS]).

Ο Πίνακας 19 παρακάτω παρουσιάζει το ORR κατά BICR και κατά την αξιολόγηση ερευνητή στη δοκιμή AURA2. Από τους 210 ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον μία δόση TAGRISSO® (FAS), οι 128 είχαν επιβεβαιωμένη ανταπόκριση κατά BICR, με ORR 61,0% (95% CI: 54,0% έως 67,6%), και οι 135 είχαν επιβεβαιωμένη ανταπόκριση κατά την αξιολόγηση ερευνητή, με ORR 64,3% (95% CI: 57,4% έως 70,8%).

Και οι 383 ασθενείς που ήταν κατάλληλοι για τη δοκιμή AURA2, επανεξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test. Από τους 233 T790M-θετικούς ασθενείς που εισήχθησαν στη δοκιμή AURA 2, 225 ήταν T790M+ σύμφωνα με το **cobas** EGFR Test και 204 συμπεριλήφθηκαν στο FAS.

Από τους 204 ασθενείς που έλαβαν TAGRISSO® (FAS), οι 127 είχαν επιβεβαιωμένη ανταπόκριση κατά BICR, με ORR 62,3% (95% CI: 55,2% έως 68,9%), και οι 133 είχαν επιβεβαιωμένη ανταπόκριση κατά την αξιολόγηση ερευνητή, με ORR 65,2% (95% CI: 58,2% έως 71,7%).

Πίνακας 19 Κλινικό όφελος για τους T790M+ ασθενείς που εξετάστηκαν με το cobas EGFR Test στη δοκιμή AURA2

		AURA2			cobas EGFR Test (IVD) T790M-θετικοί		
Σύνολο ανάλυσης	Αξιολόγηση από	N	Αριθμός ασθενών με επιβεβαιωμένη ανταπόκριση	ORR (95% CI)	N	Αριθμός ασθενών με επιβεβαιωμένη ανταπόκριση	ORR (95% CI)
Πλήρες σύνολο ανάλυσης (FAS)	Τυφλή ανεξάρτητη κεντρική ανασκόπηση	210	128	61,0% (54,0%, 67,6%)	204	127	62,3% (55,2%, 68,9%)
	Ερευνητής		135	64,3% (57,4%, 70,8%)		133	65,2% (58,2%, 71,7%)

FLAURA

I. Δοκιμή φάσης III για το TAGRISSO® ως θεραπεία πρώτης γραμμής

Η δοκιμή FLAURA¹⁰ ήταν μια διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης III για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του TAGRISSO® έναντι του προτύπου περίθαλψης [SoC: EGFR-TKI (γεφιτινίμη ή ερλοτινίμη)], ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), οι οποίοι δεν είχαν λάβει στο παρελθόν συστηματική θεραπεία για προχωρημένη νόσο και των οποίων οι όγκοι εμφάνιζαν τοπικά ή κεντρικά επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης του EGFR, μεταλλάξεις Ex19del ή μεταλλάξεις αντικατάστασης L858R, που αναφέρονται συνολικά ως EGFRm θετικές. Το κύριο τελικό σημείο της μελέτης FLAURA ήταν η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) σύμφωνα με την αξιολόγηση των ασθενών από τον ερευνητή στο πλήρες σύνολο ανάλυσης [Full Analysis Set (FAS): όλοι οι τυχαιοποιημένοι ασθενείς παγκοσμίως].

Συνολικά 994 ασθενείς υποβλήθηκαν σε εξέταση διαλογής για τυχαιοποίηση στη μελέτη. Τα δείγματα 809 από αυτούς τους ασθενείς εξετάστηκαν με κεντρικό **cobas** EGFR Test είτε προοπτικά κατά την εξέταση διαλογής είτε αναδρομικά. Από τους 556 τυχαιοποιημένους ασθενείς (289 τυχαιοποιήθηκαν βάσει της κεντρικής εξέτασης ιστού **cobas** και 267 τυχαιοποιήθηκαν βάσει τοπικής εξέτασης), επιβεβαιώθηκε ότι 500 ασθενείς εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα EGFRm στο **cobas**. Από τους 267 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν βάσει τοπικής εξέτασης, 211 ασθενείς εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα EGFRm στο **cobas**, 41 ασθενείς δεν έλαβαν αποτέλεσμα εξέτασης **cobas** λόγω έλλειψης δείγματος ή ανεπαρκούς δείγματος, 9 ασθενείς έλαβαν μη έγκυρο αποτέλεσμα εξέτασης **cobas** και 6 ασθενείς έλαβαν αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μετάλλαξης («No Mutation Detected») στην εξέταση **cobas**.

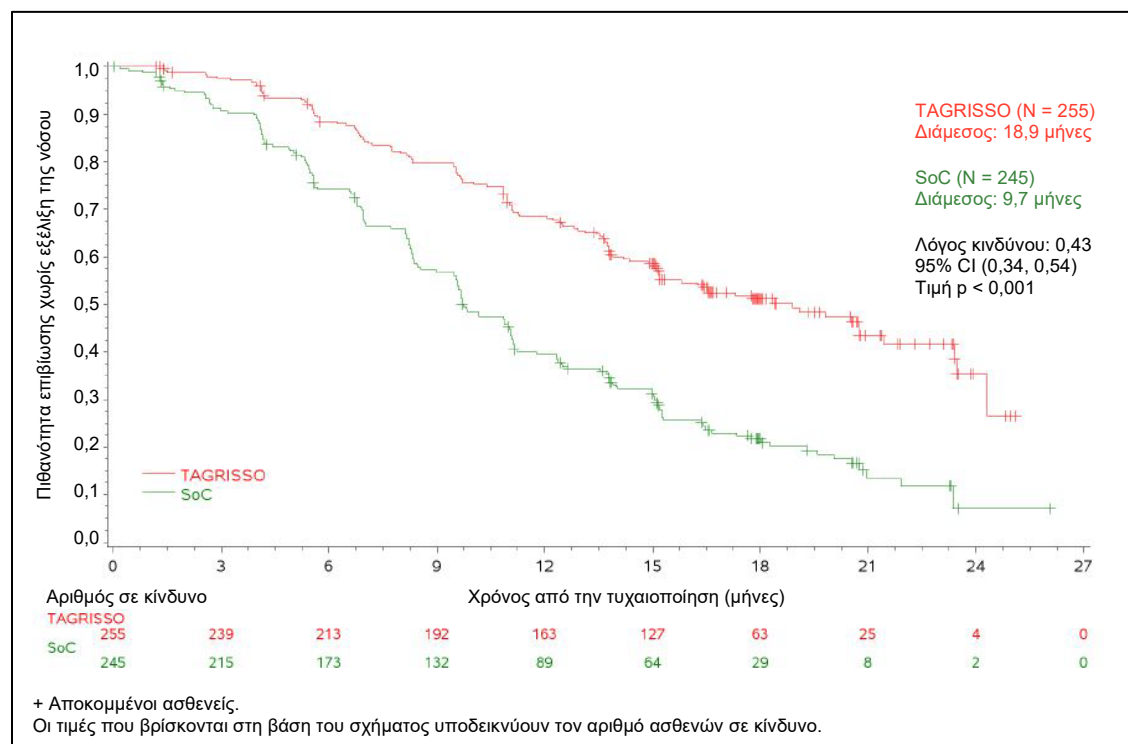
Πίνακας 20 παρακάτω παρουσιάζει τον σχετικό στιγμιαίο κίνδυνο (HR) για την PFS σύμφωνα με την αξιολόγηση από τον ερευνητή για το πλήρες σύνολο ανάλυσης και τον κύριο πληθυσμό συσκευής (ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα EGFRm σε κεντρική εξέταση ιστού **cobas**). Το HR για την PFS σύμφωνα με την αξιολόγηση από τον ερευνητή για το πλήρες σύνολο ανάλυσης (N = 556), βάσει στρωματοποιημένου ελέγχου log rank, ήταν 0,46 (95% CI: 0,37, 0,57). Η ίδια σημειική εκτίμηση προέκυψε από ένα μη προσαρμοσμένο μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox. Το HR για την PFS σύμφωνα με την αξιολόγηση από τον ερευνητή για τον κύριο πληθυσμό συσκευής (N = 500), υπολογισμένο με μη προσαρμοσμένο μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox, ήταν 0,43 (95% CI: 0,34, 0,54). Η κλινική αποτελεσματικότητα που παρατηρήθηκε στον κύριο πληθυσμό συσκευής παρουσίαζε συμφωνία με την αποτελεσματικότητα στο πλήρες σύνολο ανάλυσης. Η καμπύλη Kaplan-Meier της PFS σύμφωνα με την αξιολόγηση του ερευνητή για τον κύριο πληθυσμό συσκευής παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.

Πίνακας 20 Επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου σύμφωνα με την αξιολόγηση του ερευνητή για το πλήρες σύνολο ανάλυσης της μελέτης FLAURA και για τον κύριο πληθυσμό συσκευής (θετικός πληθυσμός cobas EGFR Test)

	Πλήρες σύνολο ανάλυσης μελέτης FLAURA N = 556		Θετικός πληθυσμός cobas EGFR Test στη μελέτη FLAURA (κύριος πληθυσμός συσκευής) N = 500	
	Οσιμερτινίμπη (N = 279)	Γεφιτινίμπη ή ερλοτινίμπη (N = 277)	Οσιμερτινίμπη (N = 255)	Γεφιτινίμπη ή ερλοτινίμπη (N = 245)
PFS				
Αριθμός συμβάντων (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Διάρκεια PFS σε μήνες (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)
Λόγος κινδύνου (95% CI) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
Αμφίπλευρη τιμή p ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a μη προσαρμοσμένο μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox

Σχήμα 4 Διάγραμμα Kaplan-Meier της PFS ανά θεραπεία, για ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε μετάλλαξη μέσω του cobas EGFR Test (αξιολόγηση ερευνητή) στη μελέτη FLAURA



II. Ανάλυση προτύπου περίθαλψης για το IRESSA®

Διενεργήθηκε ξεχωριστή ανάλυση για ασθενείς tEGFR+ που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® (γεφιτινίμπη) στο σκέλος ελέγχου της μελέτης FLAURA. Από τους συνολικά 178 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IRESSA®, 174 εμφάνισαν, σύμφωνα με αξιολόγηση από τον ερευνητή, αντικειμενική ανταπόκριση [(ORR = 67,8% (118/174, 95% CI: 60,6%, 74,3%, POP0 στον Πίνακα 21)].

Από τους 79 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® και τυχαιοποιήθηκαν με κεντρική εξέταση ιστού **cobas** (ο κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας), 57 εμφάνισαν αντικειμενική ανταπόκριση με ORR 72,2% (95% CI: 61,4%, 80,8%, POP1 στον Πίνακα 21).

Το θεραπευτικό αποτέλεσμα του IRESSA®, βάσει της εξέτασης ιστού **cobas**, διατηρήθηκε σε άλλους πληθυσμούς ασθενών με ORR που κυμαίνονταν από 64,2% (POP2, εγγεγραμμένοι σε τοπικές εξετάσεις και επίσης ασθενείς tEGFR+ βάσει **cobas**) έως 68,5% (POP3, όλοι οι ασθενείς tEGFR+ βάσει **cobas**) (Πίνακας 21 και Σχήμα 5). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν για την αρχική μελέτη καταγραφής (IFUM) για τους ασθενείς που επιλέχθηκαν για το IRESSA®.¹³

Πίνακας 21 Αποτελέσματα ORR για διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών βάσει του cobas EGFR Test σε δείγματα ιστού

Αντικειμενική ανταπόκριση	Τυχαιοποιημένοι ασθενείς στο σκέλος προτύπου περίθαλψης που έλαβαν θεραπεία με IRESSA®				
	Κεντρικά τυχαιοποιημένοι (tEGFR+ βάσει cobas)	Τοπικά τυχαιοποιημένοι (tEGFR+ βάσει τοπικής εξέτασης)			Σύνολο
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Μη έγκυρο/ Άγνωστο	
Αρ. ασθενών	79	70	2	23	174
Ανταπόκριση	57	45	1	15	118
Χωρίς ανταπόκριση	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%)		-	-	-

Σημείωση: Οι ασθενείς χωρίς αποτελέσματα αντικειμενικής ανταπόκρισης αποκλείστηκαν.

Σημείωση: tEGFR = EGFR ιστού, CI = (τιμή) διάστημα εμπιστοσύνης.

POP = Πληθυσμός (υποομάδα).

POP1: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει εξέτασης ιστού **cobas** (κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας για την εξέταση ιστού **cobas**).

POP2: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού.

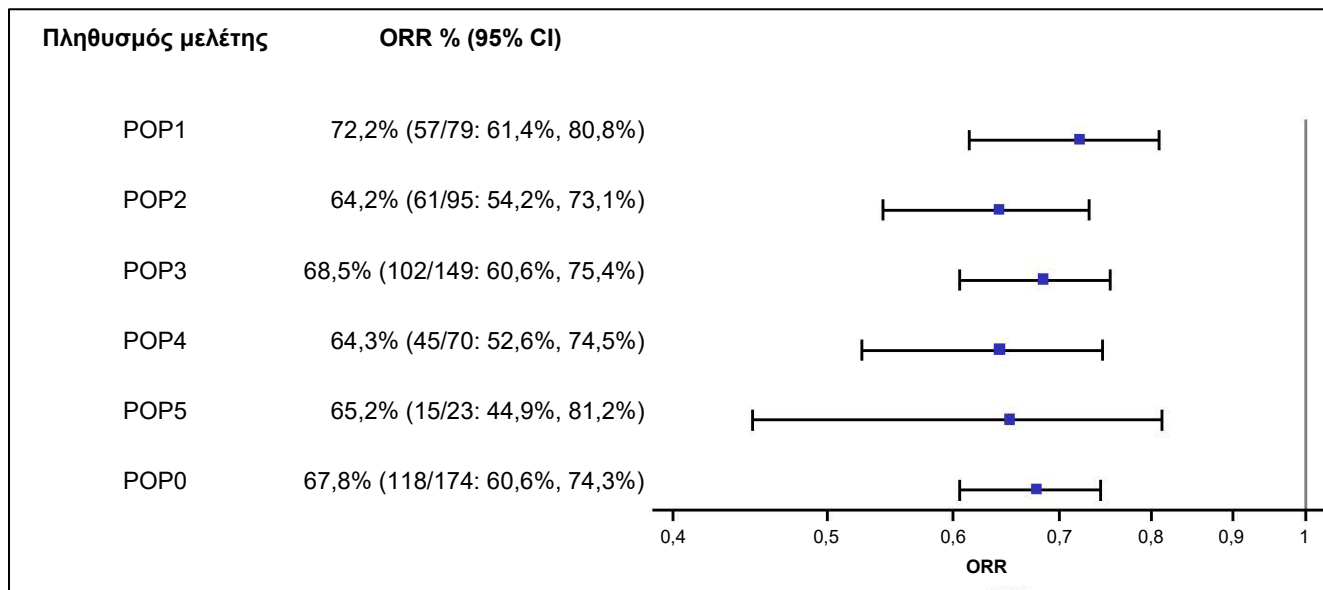
POP3: ORR για ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα βάσει εξέτασης ιστού **cobas**.

POP4: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού, με επιβεβαίωση βάσει εξέτασης ιστού **cobas**.

POP5: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού, με μη έγκυρο αποτέλεσμα εξέτασης ιστού ή χωρίς εξέταση ιστού **cobas**.

POP0: ORR για όλους τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IRESSA®.

Σχήμα 5 Διαγράμματα Forest των ORR βάσει του cobas EGFR Test σε δείγματα ιστού για διαφορετικούς πληθυσμούς



POP = Πληθυσμός (υποομάδα).

POP1: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει εξέτασης ιστού **cobas** (κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας για την εξέταση ιστού **cobas**).

POP2: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού.

POP3: ORR για ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα βάσει εξέτασης ιστού **cobas**.

POP4: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού, με επιβεβαίωση βάσει εξέτασης ιστού **cobas**.

POP5: ORR για ασθενείς τυχαιοποιημένους βάσει τοπικής εξέτασης ιστού, με μη έγκυρο αποτέλεσμα εξέτασης ιστού ή χωρίς εξέταση ιστού **cobas**.

POP0: ORR για όλους τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IRESSA®.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Προετοιμασία δειγμάτων

Ανατρέξτε στο kit προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®** (M/N 07247737190) για την απομόνωση DNA από δείγματα πλάσματος.

Υλικά και αντιδραστήρια

Παρεχόμενα υλικά και αντιδραστήρια

Κιτ/Κασέτες	Περιεχόμενα και συστατικά αντιδραστηρίων	Ποσότητα ανά εξέταση	Σύμβολο και προειδοποίηση ασφάλειας
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 Εξετάσεις (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Κύριο Μίγμα 1) (M/N: 06471366001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I
	EGFR MMX-2 (EGFR Κύριο Μίγμα 2) (M/N: 06471382001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I

Κιτ/Κασέτες	Περιεχόμενα και συστατικά αντιδραστηρίων	Ποσότητα ανά εξέταση	Σύμβολο και προειδοποίηση ασφάλειας
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 Εξετάσεις (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Κύριο Μίγμα 3) (M/N: 07248601001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Χλωριούχο κάλιο Γλυκερόλη EDTA Tween 20 3,13% Διμεθυλοσουλφοξείδιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου < 0,10% dNTP < 0,01% Z05-AS1 DNA πολυμεράση (μικροβιακή) < 0,01% Ένζυμο AmpErase (ουρακίλη-N-γλυκοζυλάση) (μικροβιακό) < 0,01% Απταμερές < 0,01% Πρόσθιοι και αντίστροφης φοράς εκκινητές EGFR < 0,01% Ιχνηθέτες EGFR με φθορίζουσα επισήμανση	2 × 0,48 mL	Δ/I
	MGAC (Οξικό μαγνήσιο) (M/N: 05854326001) Οξικό μαγνήσιο 0,09% Αζίδιο του νατρίου	6 × 0,2 mL	Δ/I
	EGFR MC (Ορός ελέγχου μετάλλαξης EGFR) (M/N: 06471455001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris EDTA Poly-rA RNA (συνθετικό) 0,05% Αζίδιο του νατρίου < 0,1% Πλασμιδιακό DNA που περιέχει αλληλουχίες εξωνίων 18, 19, 20 και 21 EGFR (μικροβιακό) < 0,1% DNA άγριου τύπου (wild-type) EGFR (καλλιέργεια κυττάρων)	6 × 0,1 mL	Δ/I
	DNA SD (Αραιωτικό Δείγματος DNA) (M/N: 05854474001) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,09% Αζίδιο του νατρίου	2 × 3,5 mL	Δ/I

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Αντιδραστήριο	Θερμοκρασία φύλαξης	Χρόνος φύλαξης
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2°C έως 8°C	Μετά το άνοιγμα, παραμένει σταθερό για 4 χρήσεις σε διάστημα 90 ημερών ή μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, όποιο από τα δύο προηγηθεί χρονικά.

*Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και το κύριο μίγμα εργασίας (που προετοιμάζεται με την προσθήκη **MGAC** στο **EGFR MMX-1** ή στο **EGFR MMX-2** ή στο **EGFR MMX-3 v2**) θα πρέπει να προστατεύονται από την παρατεταμένη έκθεση στο φως. Το Κύριο Μίγμα εργασίας θα πρέπει να αποθηκεύεται στους 2°C έως 8°C στο σκοτάδι. Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου που έχουν προετοιμαστεί πρέπει να προστίθενται εντός 1 ώρας από την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας. Η ενίσχυση πρέπει να ξεκινήσει εντός 1 ώρας από την προσθήκη των επεξεργασμένων δειγμάτων και των ορών ελέγχου στο κύριο μίγμα εργασίας.

Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά

Υλικά	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Λευκαντικό	Οποιοδήποτε προμηθευτή
70% Αιθανόλη	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Αποστειρωμένες ορολογικές πιπέτες μίας χρήσης 5 και 25 mL	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Πλάκα μικροβυθισμάτων (πλάκα AD) και μεμβράνη σφράγισης πλάκας του συστήματος cobas® 4800	Roche 05232724001
Συσκευή τοποθέτησης μεμβράνης σφράγισης συστήματος cobas® 4800 (παρέχεται με την εγκατάσταση του συστήματος cobas® 4800)	Roche 04900383001
Ρυθμιζόμενες συσκευές πιπέτας* (χωρητικότητα 5–1.000 µL)	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Ακροφύσια πιπέτας με φραγή αερολυμάτων ή θετική μετατόπιση χωρίς DNase	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος* (με απόδοση 20.000 × g)	Eppendorf 5430 ή 5430R ή αντίστοιχο
Καταψύκτης με δυνατότητα αποθήκευσης στους -25°C έως -15°C	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου με καπάκι ασφαλείας (1,5 mL, χωρίς RNase/DNase, τύπου PCR)	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Υποδοχείς κωνικών σωληναρίων και σωληναρίων μικροφυγόκεντρου	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Αναδευτήρας τύπου Vortex*	Οποιοδήποτε προμηθευτή
Γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα	Οποιοδήποτε προμηθευτή

* Όλα τα στοιχεία εξοπλισμού θα πρέπει να συντηρούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα υλικά που πωλούνται χωριστά, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Roche.

Όργανα και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Απαιτούμενα όργανα και λογισμικό, δεν παρέχονται
Αναλυτής cobas® z 480
Μονάδα Ελέγχου Συστήματος cobas® 4800 με Λογισμικό Συστήματος, έκδοση 2.2 ή νεότερης
Λογισμικό πακέτου ανάλυσης EGFR πλάσματος P1, έκδοση 1.0 ή νεότερη*
Συσκευή Ανάγνωσης Γραμμωτού Κώδικα, εξωτερική με USB
Εκτυπωτής

* Ανατρέξτε στην Κάρτα πληροφοριών προϊόντος του kit **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001) για την τρέχουσα έκδοση λογισμικού.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα υλικά που πωλούνται χωριστά, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Roche.

Προφυλάξεις και απαιτήσεις χειρισμού

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Όπως συμβαίνει με όλες τις διαδικασίες εξέτασης, η ορθή εργαστηριακή πρακτική είναι απαραίτητη για τη σωστή εκτέλεση αυτής της ανάλυσης.

- Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
- Διατίθενται Δελτία Δεδομένων Ασφάλειας (SDS) κατόπιν υποβολής σχετικού αιτήματος στα γραφεία της Roche στην περιοχή σας.
- Αυτή η εξέταση προορίζεται για χρήση με δείγματα πλάσματος NSCLC. Τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως μολυσματικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με ορθές εργαστηριακές διαδικασίες, όπως αυτές που περιγράφονται στην τεκμηρίωση Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ και στο έγγραφο CLSI M29-A4.¹⁷
- Συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων πιπέτων μίας χρήσης με ακροφύσια χωρίς DNase.

Ορθή εργαστηριακή πρακτική

- Μην εκτελείτε αναρρόφηση με πιπέτα από το στόμα.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα και η κατανάλωση τροφίμων και ποτών στους χώρους εργασίας του εργαστηρίου.
- Πλένετε καλά τα χέρια σας μετά το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων του kit.
- Φοράτε προστατευτικά γυαλιά, ποδιές εργαστηρίου και γάντια μίας χρήσης κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων. Αποφεύγετε την επαφή των υλικών αυτών με το δέρμα, τα μάτια ή τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση επαφής, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονη ποσότητα νερού. Αν δεν υπάρξει άμεση αντιμετώπιση, μπορεί να προκληθούν εγκαύματα. Σε περίπτωση διαρροής αντιδραστηρίου, αραιώστε με νερό πριν το σκουπίσετε.
- Καθαρίζετε καλά και απολυμαίνετε όλες τις επιφάνειες εργασίας του εργαστηρίου με φρέσκο διάλυμα 0,5% υποχλωριώδους νατρίου σε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (αραιώστε λευκαντικό οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10). Στη συνέχεια, σκουπίστε την επιφάνεια με 70% αιθανόλη.

Σημείωση: Τα υγρά λευκαντικά οικιακής χρήσης που διατίθενται στο εμπόριο περιέχουν κατά κανόνα υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 5,25%. Με την αραιώση λευκαντικού οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10 παράγεται διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5%.

Επιμόλυνση

- Πρέπει να φοράτε γάντια και να τα αλλάζετε πριν από το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων του cobas EGFR Test, ώστε να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση. Φροντίζετε να μην επιμολύνονται τα γάντια κατά το χειρισμό των δειγμάτων.
- Πρέπει να αλλάζετε γάντια συχνά, για να μειωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης.
- Πρέπει να αλλάζετε γάντια πριν από την έξοδό σας από χώρους απομόνωσης DNA ή σε περίπτωση που αυτά έρθουν σε επαφή με διαλύματα, ή όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης για κάποιο δείγμα.
- Αποφεύγετε την επιμόλυνση των αντιδραστηρίων από μικρόβια και ριβονουκλεάσες.
- Καθαρίζετε καλά το χώρο εργασίας για την ενίσχυση και ανίχνευση πριν από την προετοιμασία του Κύριου Μίγματος εργασίας. Τα υλικά και ο εξοπλισμός θα πρέπει να προορίζονται αποκλειστικά για κάθε μεμονωμένη ενέργεια και όχι για άλλες ενέργειες, ούτε να μεταφέρονται από χώρο σε χώρο. Για παράδειγμα, οι συσκευές πιπέτας και τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση DNA δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία αντιδραστηρίων για ενίσχυση και ανίχνευση.

- Συνιστάται ιδιαίτερα η ροή των εργασιών στο εργαστήριο να εκτελείται σε μονόδρομη κατεύθυνση, και να ολοκληρώνετε μία ενέργεια πριν προχωρήσετε στην επόμενη. Για παράδειγμα, η απομόνωση DNA πρέπει να ολοκληρωθεί πριν ξεκινήσει η ενίσχυση και η ανίχνευση. Η απομόνωση DNA θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από ό,τι η ενίσχυση και η ανίχνευση. Για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του κύριου μίγματος εργασίας από δείγματα DNA, ο χώρος εργασίας για την ενίσχυση και την ανίχνευση θα πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά πριν από την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας.

Ορθή χρήση

- Μην χρησιμοποιείτε τα κιτ μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Μην συνδυάζετε αντιδραστήρια από διαφορετικά κιτ ή παρτίδες.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αναλώσιμα μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Όλα τα αναλώσιμα προορίζονται για μία χρήση. Μην τα επαναχρησιμοποιείτε.
- Όλα τα στοιχεία εξοπλισμού θα πρέπει να συντηρούνται κατάλληλα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Απόρριψη

- Τα **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC και DNA SD** περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με το μόλυβδο και το χαλκό των σωληνώσεων και να δημιουργήσει υψηλής εκρηκτικότητας αζίδια μετάλλου. Κατά την απόρριψη διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου στους νεροχύτες των εργαστηρίων, ρίχνετε άφθονη ποσότητα κρύου νερού για να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίου.
- Η απόρριψη μη χρησιμοποιημένων αντιδραστηρίων και απορριμμάτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς.

Διαρροή υγρών και καθαρισμός

- Σε περίπτωση διαρροής υγρού πάνω στο όργανο **cobas® 4800**, ακολουθήστε τις οδηγίες καθαρισμού που περιγράφονται στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.
- Μην χρησιμοποιείτε διάλυμα υποχλωριούχου νατρίου (λευκαντικό) για τον καθαρισμό του αναλυτή **cobas® z 480**. Καθαρίζετε τον αναλυτή **cobas® z 480** σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.
- Για επιπλέον προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες σχετικά με τη μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης για τον αναλυτή **cobas® z 480**, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.

Συλλογή, μεταφορά και φύλαξη των δειγμάτων

Σημείωση: Όλα τα δείγματα πρέπει να θεωρούνται μολυσματικά και ο χειρισμός τους πρέπει να είναι ανάλογος.

Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων

Roche σωληνάριο συλλογής ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος DNA

Πλάσμα από ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί στα Roche σωληνάρια συλλογής ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος DNA (Σωληνάρια Roche cfDNA) έχει επικυρωθεί για χρήση με το **cobas EGFR Test**.

Το πλάσμα θα πρέπει να διαχωρίζεται από το αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA εντός 7 ημερών από τη συλλογή. Δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί στο σωληνάριο Roche cfDNA παραμένουν σταθερά για 7 ημέρες, όταν αποθηκεύονται ή μεταφέρονται σε θερμοκρασία 15–25°C, με παροδικές μετακινήσεις έως 16 ώρες σε θερμοκρασία 15–30°C. Μετά τον διαχωρισμό του πλάσματος, αποθηκεύστε όπως υποδεικνύεται στην ενότητα **Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων**, παρακάτω.

Σημείωση: Έχει παρατηρηθεί αιμόλυση σε πλάσμα διαχωρισμένο από αίμα που έχει συλλεχθεί στο σωληνάριο Roche cfDNA. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης $\leq 2,0$ g/L δεν παρεμβαίνουν στην απόδοση του **cobas EGFR Test**.

Σωληνάριο συλλογής K2 EDTA

Πλάσμα από ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάρια συλλογής K2 EDTA έχει επικυρωθεί για χρήση με το **cobas EGFR Test**.

Ολικό αίμα σε K2 EDTA μπορεί να αποθηκεύεται έως 8 ώρες σε θερμοκρασία $\leq 30^\circ\text{C}$. Μετά τον διαχωρισμό του πλάσματος, αποθηκεύστε όπως υποδεικνύεται στην ενότητα **Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων**, παρακάτω.

Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων

Η μεταφορά των δειγμάτων πλάσματος πρέπει να πληροί τους κρατικούς και τοπικούς κανονισμούς σχετικά με τη μεταφορά αιτιολογικών παραγόντων.¹⁸

Τα δείγματα πλάσματος είναι σταθερά σε μία από τις εξής συνθήκες:

Θερμοκρασία φύλαξης δειγμάτων πλάσματος	$\leq -70^\circ\text{C}$	-15°C έως -25°C	2°C έως 8°C	15°C έως 30°C
Χρόνος φύλαξης για πλάσμα σε Roche cfDNA	Έως 30 ημέρες	Έως 30 ημέρες	Έως 7 ημέρες	Έως 1 ημέρα
Χρόνος φύλαξης για πλάσμα σε K2 EDTA	Έως 12 μήνες	Έως 12 μήνες	Έως 3 ημέρες	Έως 1 ημέρα

Φύλαξη και σταθερότητα των επεξεργασμένων δειγμάτων

Το επεξεργασμένο δείγμα (εκχυλισμένο cfDNA) από πλάσμα που προέρχεται από σωληνάριο Roche cfDNA ή σωληνάριο K2 EDTA παραμένει σταθερό για ένα από τα εξής διαστήματα:

Θερμοκρασία φύλαξης εκχυλισμένου cfDNA	-15°C έως -25°C	2°C έως 8°C	15°C έως 30°C
Χρόνος φύλαξης	Έως 2 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης σε διάστημα 60 ημερών	Έως 21 ημέρες	Έως 7 ημέρες

Το εκχυλισμένο cfDNA πρέπει να χρησιμοποιείται εντός των συνιστώμενων διαστημάτων φύλαξης ή πριν από την ημερομηνία λήξης του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®** που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του DNA, όποιο από τα δύο προηγηθεί χρονικά.

Πριν από τη χρήση αποθηκευμένων αρχικών δειγμάτων εκχυλισμένου DNA, περιδινίστε και φυγοκεντρίστε παλμικά το σωληνάριο έκλουσης που περιέχει το αρχικό δείγμα.

Διαδικασία εξέτασης

Εκτέλεση της εξέτασης

Εικόνα 6 Ροή εργασίας cobas EGFR Test με το kit προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA cobas®

1	Εκκινήστε το σύστημα.
2	Εκτελέστε συντήρηση του οργάνου.
3	Αφαιρέστε τα δείγματα και τα αντιδραστήρια από τον χώρο φύλαξης.
4	Προετοιμάστε τα δείγματα για δέσμευση στη στήλη.
5	Πραγματοποιήστε απομόνωση του DNA.
6	Πραγματοποιήστε έκλυση του DNA.
7	Δημιουργήστε μια εντολή εργασίας και εκτυπώστε τη διάταξη της πλάκας.
8	Προετοιμάστε τα αντιδραστήρια ενίσχυσης.
9	Τοποθετήστε τα αντιδραστήρια ενίσχυσης στην πλάκα μικροβυθισμάτων (AD)
10	Τοποθετήστε το δείγμα στην πλάκα AD
11	Σφραγίστε την πλάκα AD
12	Τοποθετήστε την πλάκα AD στον αναλυτή cobas® z 480
13	Ξεκινήστε την ανάλυση.
14	Εξετάστε τα αποτελέσματα.
15	Με χρήση LIS: Αποστέλλετε τα αποτελέσματα στο σύστημα LIS.
16	Αφαιρέστε την πλάκα από τον αναλυτή.

Οδηγίες χρήσης

Σημείωση: Για χρήση με το **cobas EGFR Test**, έχει επικυρωθεί μόνο πλάσμα διαχωρισμένο από αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA ή σε σωληνάριο K2 EDTA.

Σημείωση: Για λεπτομερείς οδηγίες λειτουργίας του αναλυτή **cobas® z 480**, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο οργάνου του αναλυτή **cobas® z 480**.

Αριθμός αναλύσεων

Μια μεμονωμένη ανάλυση μπορεί να περιλαμβάνει από 1 έως 30 δείγματα (συν τους ορούς ελέγχου) ανά πλάκα AD 96 βυθισμάτων. Όταν αναλύονται περισσότερα από 24 δείγματα, απαιτούνται πολλά kit **cobas EGFR Test**.

Το kit **cobas EGFR Test** περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για 8 αναλύσεις 3 δειγμάτων (συν τους ορούς ελέγχου) για μέγιστο αριθμό 24 δειγμάτων ανά kit.

Ορός ελέγχου πλήρους επεξεργασίας

Αυτή η εξέταση απαιτεί ορό ελέγχου πλήρους επεξεργασίας. Για κάθε ανάλυση, επεξεργαστείτε έναν αρνητικό ορό ελέγχου παράλληλα με το(τα) δείγμα(-τα) ξεκινώντας με τη διαδικασία απομόνωσης DNA.

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα πλάσματος πραγματοποιείται με το kit προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®** (M/N 07247737190).

Ενίσχυση και ανίχνευση

Σημείωση: Για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση του κύριου μίγματος εργασίας με δείγματα DNA, η ενίσχυση και η ανίχνευση θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνο στον οποίο πραγματοποιείται η απομόνωση DNA. Καθαρίζετε καλά το χώρο εργασίας για την ενίσχυση και ανίχνευση πριν από την προετοιμασία του Κύριου Μίγματος εργασίας. Για σωστό καθαρισμό, θα πρέπει να σκουπίζετε καλά όλες τις επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων και των συσκευών πιπέτας, με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% και, στη συνέχεια, με διάλυμα αιθανόλης 70%. Τα υγρά λευκαντικά οικιακής χρήσης που διατίθενται στο εμπόριο περιέχουν κατά κανόνα υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 5,25%. Με την αραίωση λευκαντικού οικιακής χρήσης σε αναλογία 1:10 παράγεται διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5%.

Ρύθμιση του οργάνου

Για λεπτομερείς οδηγίες ρύθμισης του cobas® z 480, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800.

Ρύθμιση εντολής εξέτασης

Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τα βήματα της ροής εργασιών EGFR, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800.

Δημιουργήστε έναν χάρτη πλάκας με τις θέσεις όλων των δειγμάτων και των ορών ελέγχου της ανάλυσης. Σε μια ανάλυση που περιλαμβάνει μόνο δείγματα πλάσματος, ο Ορός ελέγχου μετάλλαξης τοποθετείται στις θέσεις **A01–A03** της πλάκας. Ο αρνητικός ορός ελέγχου τοποθετείται στις θέσεις **B01–B03** της πλάκας. Έπειτα, τα δείγματα προστίθενται σε σετ 3 στηλών, ξεκινώντας από τις θέσεις **C01–C03** έως **H10–H12**, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.

Η ανάλυση με το cobas EGFR Test μπορεί να γίνει σε μικτή λειτουργία (π.χ. εξέταση ιστού EGFR με εξέταση πλάσματος EGFR). Οι θέσεις του ορού ελέγχου ποικίλλουν ανάλογα με τις επιλεγμένες εξετάσεις και τους αριθμούς των δειγμάτων. Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή Λογισμικού του cobas® EGFR Mutation Test v2 ή στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος cobas® 4800 ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος cobas® 4800, για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την προετοιμασία μιας ανάλυσης με μικτές εξετάσεις.

Σχήμα 7 Διάταξη της πλάκας για το cobas EGFR Test

Σειρά / Στήλη	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

Όπου: MC = Ορός ελέγχου μετάλλαξης, NEG = Αρνητικός ορός ελέγχου, S# = ID δείγματος και MMX # αντιστοιχεί στο αντιδραστήριο κύριου μίγματος 1, 2 ή 3 v2.

Σημείωση: Κάθε δείγμα θα πρέπει να κατανέμεται σε τρεις συνεχόμενες στήλες σε μία σειρά, ώστε να δοθεί αποτέλεσμα.

Σημείωση: Το κύριο μίγμα εργασίας 1 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 01, 04, 07 και 10 της πλάκας. Το κύριο μίγμα εργασίας 2 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 02, 05, 08 και 11 της πλάκας. Το κύριο μίγμα εργασίας 3 v2 πρέπει να τοποθετείται στις στήλες 03, 06, 09 και 12 της πλάκας.

Σημείωση: Σε μία πλάκα μπορούν να τοποθετηθούν έως 30 δείγματα. Εάν απαιτούνται περισσότερα από ένα κιτ αντιδραστηρίων για την επεξεργασία όλων των δειγμάτων της πλάκας, τότε τα κιτ θα πρέπει να προέρχονται όλα από την ίδια παρτίδα.

Προετοιμασία αντίδρασης

Προετοιμασία των κύριων μιγμάτων εργασίας (MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2)

Σημείωση: Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και το κύριο μίγμα εργασίας είναι ευαίσθητα στο φως και πρέπει να προστατεύονται από παρατεταμένη έκθεση στο φως.

Σημείωση: Λόγω του ιξώδους των αντιδραστηρίων **EGFR MMX** και του κύριου μίγματος εργασίας, η έγχυση με πιπέτα θα πρέπει να πραγματοποιείται αργά, ώστε να διοχετεύεται ολόκληρη η ποσότητα μίγματος από το ακροφύσιο.

Σημείωση: Τα **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** και **EGFR MMX-3 v2** ενδέχεται να διαθέτουν γαλάζια/πορφυροειδή όψη. Αυτό δεν επηρεάζει την απόδοση του αντιδραστηρίου.

Σημείωση: Προετοιμάστε τρεις κύριες ποσότητες κύριου μίγματος εργασίας, μία με **EGFR MMX-1**, μία με **EGFR MMX-2** και μία με **EGFR MMX-3 v2**, σε ξεχωριστά σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 mL.

- Υπολογίστε τον όγκο του **EGFR MMX-1** ή **EGFR MMX-2** ή του **EGFR MMX-3 v2** που απαιτείται για κάθε κύριο μίγμα εργασίας, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απαιτούμενος όγκος του EGFR MMX-1 ή του EGFR MMX-2 ή του EGFR MMX-3 v2} = (\text{αριθμός δειγμάτων} + 2 \text{ οροί ελέγχου} + 1) \times 20 \mu\text{L}$$

- Υπολογίστε τον όγκο **MGAC** που απαιτείται για κάθε κύριο μίγμα εργασίας, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απαιτούμενος όγκος MGAC} = (\text{αριθμός δειγμάτων} + 2 \text{ οροί ελέγχου} + 1) \times 5 \mu\text{L}$$

Ο Πίνακας 22 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του όγκου κάθε αντιδραστηρίου που απαιτείται για την προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας βάσει του αριθμού δειγμάτων που περιλαμβάνονται στην ανάλυση.

Πίνακας 22 Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για τα μίγματα εργασίας MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2

		Αριθμός δειγμάτων*									
		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
Συνολικός όγκος για κάθε Κύριο Μίγμα Εργασίας (μL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Όγκοι για αριθμό δειγμάτων βάσει του αθροίσματος του αριθμού δειγμάτων + 2 οροί ελέγχου + 1

- Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό φιαλιδίων **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** και **MGAC** από το χώρο φύλαξης σε θερμοκρασία 2°C έως 8°C. Περιδινήστε κάθε αντιδραστήριο για 5 δευτερόλεπτα και συγκεντρώστε το υγρό στον πυθμένα του σωληναρίου πριν από τη χρήση. Επισημάνετε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου για το μίγμα εργασίας MMX-1, το μίγμα εργασίας MMX-2 και το μίγμα εργασίας MMX-3 v2.
- Προσθέστε τον υπολογισμένο όγκο **EGFR MMX-1** ή **EGFR MMX-2** ή **EGFR MMX-3 v2** στα αντίστοιχα σωληνάρια κύριου μίγματος εργασίας.

5. Προσθέστε τον υπολογισμένο όγκο **MGAC** στα σωληνάρια κύριου μίγματος εργασίας.
6. Περιδινήστε τα σωληνάρια για 3 έως 5 δευτερόλεπτα, για να διασφαλίσετε επαρκή ανάμιξη.

Σημείωση: Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου θα πρέπει να προστίθενται στην πλάκα AD εντός 1 ώρας μετά από την προετοιμασία των κύριων μιγμάτων εργασίας.

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε μόνο την πλάκα AD και τη μεμβράνη σφράγισης του συστήματος **cobas® 4800**.

Προετοιμασία της πλάκας

Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείτε αποθηκευμένα αρχικά δείγματα DNA, ακολουθήστε τις οδηγίες της ενότητας **Μεταφορά, φύλαξη και σταθερότητα των δειγμάτων**.

1. Διοχετεύστε με πιπέτα 25 µL κύριου μίγματος εργασίας σε κάθε βύθισμα αντίδρασης της πλάκας AD το οποίο απαιτείται για την ανάλυση. Μην αφήνετε το ακροφύσιο της συσκευής πιπέτας να έρθει σε επαφή με την πλάκα εκτός του βυθίσματος.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-1 (που περιέχει **EGFR MMX-1**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 01, 04, 07 και 10, όπως απαιτείται.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-2 (που περιέχει **EGFR MMX-2**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 02, 05, 08 και 11, όπως απαιτείται.
 - Προσθέστε μίγμα εργασίας MMX-3 v2 (που περιέχει **EGFR MMX-3 v2**) στα βυθίσματα της πλάκας AD, στις στήλες 03, 06, 09 και 12, όπως απαιτείται.
2. Διοχετεύστε με πιπέτα 25 µL **EGFR MC** στα βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03** της πλάκας AD. Αναμίξτε καλά χρησιμοποιώντας την πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και διοχέτευση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές.
3. Χρησιμοποιώντας νέο ακροφύσιο συσκευής πιπέτας, εκτελέστε έγχυση 25 µL **NEG** στα βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03** της πλάκας AD. Αναμίξτε καλά χρησιμοποιώντας την πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και διοχέτευση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές.

Σημείωση: Κάθε ανάλυση πρέπει να περιέχει **EGFR MC** στα βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03** και **NEG** στα βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03**, διαφορετικά η ανάλυση θα καθίσταται άκυρη από τον **cobas® z 480** αναλυτή.

Σημείωση: Αλλάζετε γάντια, όπως απαιτείται, για προστασία έναντι της επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα και της εξωτερικής επιμόλυνσης του σωληναρίου αντίδρασης PCR.

4. Χρησιμοποιώντας νέα ακροφύσια συσκευής πιπέτας για κάθε DNA δείγματος, προσθέστε 25 µL από το DNA του πρώτου δείγματος στα βυθίσματα **C01**, **C02** και **C03** της πλάκας AD, χρησιμοποιώντας νέο ακροφύσιο για την προσθήκη του DNA δείγματος σε κάθε βύθισμα. Αναμίξτε κάθε βύθισμα χρησιμοποιώντας πιπέτα για να εκτελέσετε αναρρόφηση και χορήγηση εντός του βυθίσματος τουλάχιστον δύο φορές. Επαναλάβετε αυτήν τη διαδικασία για το DNA κάθε δείγματος και ακολουθήστε το πρότυπο στο Σχήμα 7 μέχρι να φορτώσετε όλα τα δείγματα DNA στην πλάκα AD. Βεβαιωθείτε ότι όλο το υγρό έχει συγκεντρωθεί στον πυθμένα των βυθισμάτων.

Σημείωση: Πριν από τη χρήση αποθηκευμένων αρχικών δειγμάτων DNA, περιδινήστε παλμικά και φυγοκεντρίστε το σωληνάριο έκλουσης που περιέχει το αρχικό δείγμα.

5. Καλύψτε την πλάκα AD με μεμβράνη σφράγισης πλάκας (παρέχεται μαζί με τις πλάκες). Χρησιμοποιήστε τη συσκευή τοποθέτησης μεμβράνης σφράγισης, για να σφραγίσετε σταθερά την πλάκα AD με τη μεμβράνη.
6. Βεβαιωθείτε ότι όλο το υγρό έχει συγκεντρωθεί στον πυθμένα κάθε βυθίσματος πριν από την έναρξη της διαδικασίας PCR.

Σημείωση: Η ενίσχυση και η ανίχνευση θα πρέπει να ξεκινήσουν εντός 1 ώρας μετά την προσθήκη της αραίωσης του πρώτου DNA δείγματος στο κύριο μίγμα εργασίας.

Έναρξη διαδικασίας PCR

Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τα βήματα της ροής εργασιών EGFR, ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**. Όταν εμφανιστεί το αναδυόμενο παράθυρο Select test, επιλέξτε EGFR Plasma P1 και κάντε κλικ στο κουμπί OK.

Αποτελέσματα

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Σημείωση: Η επαλήθευση όλων των αναλύσεων και δειγμάτων πραγματοποιείται από το **cobas® 4800** λογισμικό.

Σημείωση: Μια έγκυρη ανάλυση εξέτασης μπορεί να περιλαμβάνει έγκυρα και μη έγκυρα αποτελέσματα δειγμάτων.

Για μια έγκυρη ανάλυση, τα αποτελέσματα δειγμάτων ερμηνεύονται όπως δείχνει ο Πίνακας 23.

Πίνακας 23 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων για το cobas EGFR Test

Αποτέλεσμα Εξέτασης	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Αποτέλεσμα ημι-ποσοτικού δείκτη (SQI)	Ερμηνεία
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Ενδέχεται να υπάρχουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις)	Ex19Del: SQ/ S768I: SQ/ L858R: SQ/ T790M: SQ/ L861Q: SQ/ G719X: SQ/ Ex20Ins: SQ/ (Ενδέχεται να υπάρχουν περισσότερες από μία μεταλλάξεις)	Ανιχνεύτηκε μετάλλαξη σε καθορισμένη στοχευμένη περιοχή EGFR.
No Mutation Detected (NMD)*	Δ/Ι	Δ/Ι	Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στις στοχευμένες περιοχές EGFR.
Μη έγκυρο	Δ/Ι	Δ/Ι	Το αποτέλεσμα του δείγματος δεν είναι έγκυρο. Επαναλάβετε την εξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα ακολουθώντας τις οδηγίες που παρατίθενται στην παρακάτω ενότητα Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα .
Failed	Δ/Ι	Δ/Ι	Η ανάλυση απέτυχε λόγω σφάλματος υλικού εξοπλισμού ή λογισμικού. Επικοινωνήστε με τα τοπικά γραφεία της Roche για την παροχή τεχνικής υποστήριξης

* Ένα αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μετάλλαξης («No Mutation Detected») δεν αποκλείει την παρουσία μετάλλαξης στις στοχευόμενες περιοχές του EGFR, καθώς τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των μεταλλαγμένων αλληλουχιών, την επάρκεια και ποιότητα του δείγματος, την απουσία αναστολέων και την επαρκή ποσότητα DNA για ανίχνευση.

Οι ενδείξεις αποτελεσμάτων βρίσκονται στην καρτέλα (οθόνη) Result ή στη στήλη (αναφορά) Flags. Ανατρέξτε στην ενότητα **Ενδείξεις αποτελεσμάτων** για περισσότερες πληροφορίες.

Ημι-ποσοτικός δείκτης (SQI)

Ο SQI είναι μια ημι-ποσοτική μέτρηση της ποσότητας του μεταλλαγμένου cfDNA σε ένα δείγμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των διαφορών του φορτίου μεταλλάξεων με την πάροδο του χρόνου. Η αύξηση της τιμής του SQI δείχνει την αύξηση της έκτασης της αντίστοιχης μετάλλαξης στόχου σε μία μεμονωμένη πηγή δείγματος, ενώ η μείωση της τιμής του SQI δείχνει τη μείωση της συνολικής ποσότητας της αντίστοιχης μετάλλαξης στόχου σε μία μεμονωμένη πηγή δείγματος. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα SQI για κάθε κατηγορία μετάλλαξης EGFR που ανιχνεύεται από την εξέταση παρουσιάζονται στα αποτελέσματα γραμμικότητας στο Σχήμα 8 – Σχήμα 14.

Επανεξέταση των δειγμάτων με μη έγκυρα αποτελέσματα

1. Εάν η ανάλυση δεν είναι έγκυρη, δεν θα υπάρχει επαρκής όγκος εκχυλισμένου DNA για κάθε δείγμα, για την επανάληψη της ενίσχυσης και την ανίχνευσης. Επαναλάβετε ολόκληρη της διαδικασία της εξέτασης για όλα τα δείγματα, ξεκινώντας με την απομόνωση DNA.
2. Εάν η ανάλυση είναι έγκυρη αλλά το δείγμα δεν είναι έγκυρο, δεν θα υπάρχει επαρκής όγκος εκχυλισμένου DNA για κάθε δείγμα, για την επανάληψη της ενίσχυσης και την ανίχνευσης. Επαναλάβετε ολόκληρη της διαδικασία της εξέτασης για το μη έγκυρο δείγμα, ξεκινώντας με την απομόνωση DNA.

Ποιοτικός έλεγχος και εγκυρότητα των αποτελεσμάτων

Κάθε ανάλυση έως 30 δειγμάτων περιλαμβάνει ένα σετ ορού ελέγχου μετάλλαξης του **cobas EGFR Test (EGFR MC)** (βυθίσματα **A01**, **A02** και **A03**) και αρνητικού ορού ελέγχου (**NEG**) (βυθίσματα **B01**, **B02** και **B03**) για τα κύρια μίγματα εργασίας MMX-1, MMX-2 και MMX-3 v2. Μια ανάλυση είναι έγκυρη εάν ο **EGFR MC** και ο **NEG** είναι έγκυροι. Εάν ένας **EGFR MC** ή ένας **NEG** δεν είναι έγκυρος, ολόκληρη η ανάλυση είναι μη έγκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

Ορός ελέγχου μετάλλαξης

Το αποτέλεσμα του **EGFR MC** πρέπει να είναι έγκυρο («Valid»). Αν τα αποτελέσματα του **EGFR MC** είναι διαρκώς μη έγκυρα, επικοινωνήστε με το τοπικό γραφείο της Roche για τεχνική υποστήριξη.

Αρνητικός ορός ελέγχου

Το αποτέλεσμα του **NEG** πρέπει να είναι έγκυρο («Valid»). Αν τα αποτελέσματα του **NEG** είναι διαρκώς μη έγκυρα, επικοινωνήστε με το τοπικό γραφείο της Roche για τεχνική υποστήριξη.

Περιορισμοί της διαδικασίας

1. Εξετάστε μόνο τους ενδεδειγμένους τύπους δειγμάτων. Το **cobas EGFR Test** έχει επικυρωθεί για χρήση με πλάσμα διαχωρισμένο από αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA ή σε σωληνάριο K2 EDTA.
2. Η απόδοση του **cobas EGFR Test** επικυρώθηκε με χρήση του κιτ προετοιμασίας δειγμάτων cfDNA **cobas®**.
3. Η ανίχνευση μετάλλαξης εξαρτάται από τον αριθμό αντιγράφων στο δείγμα και μπορεί να επηρεαστεί από την ποιότητα του δείγματος, την ποσότητα απομονωμένου DNA και την ύπαρξη ουσιών που αλληλεπιδρούν.
4. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από τις ορθές διαδικασίες μεταφοράς, φύλαξης και επεξεργασίας των δειγμάτων. Ακολουθήστε τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παρούσες Οδηγίες Χρήσης και στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**.
5. Η αναρρόφηση με πιπέτα από τον πυθμένα του σωληναρίου έκλουσης μπορεί να προκαλέσει διάσπαση του ιζήματος και να επηρεάσει δυσμενώς τα αποτελέσματα της εξέτασης.
6. Η προσθήκη του ενζύμου AmpErase στο κύριο μίγμα του **cobas EGFR Test** επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση του DNA-στόχου. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η εφαρμογή ορθών εργαστηριακών πρακτικών και η προσεκτική συμμόρφωση προς τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παρούσες Οδηγίες χρήσης, για την αποφυγή επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων.

7. Αυτό το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από προσωπικό εκπαιδευμένο στις τεχνικές PCR και στη χρήση του συστήματος **cobas**® 4800.
8. Μόνο ο αναλυτής **cobas**® z 480 έχει εγκριθεί για χρήση με αυτό το προϊόν. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλος θερμοκυκλοποιητής με οπτική ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο με το προϊόν αυτό.
9. Λόγω εγγενών διαφορών μεταξύ των τεχνολογιών, πριν από τη μετάβαση σε άλλη τεχνολογία, συνιστάται η πραγματοποίηση μελετών συσχέτισμού μεθόδων από το χειριστή στο εργαστήριο για τον ποιοτικό προσδιορισμό των διαφορών τεχνολογίας.
10. Η παρουσία αναστολέων PCR μπορεί να προκαλέσει ψευδώς αρνητικά ή άκυρα αποτελέσματα.
11. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τυχόν μεταλλάξεις στις περιοχές γονιδιωματικού DNA του γονιδίου EGFR, που καλύπτονται από τους εκκινητές ή τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στο **cobas** EGFR Test, ενδέχεται να οδηγήσουν σε αποτυχία ανίχνευσης της παρουσίας μετάλλαξης στα εξώνια 18, 19, 20, 21 (αποτελέσματα «No Mutation Detected»).
12. Το **cobas** EGFR Test παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση (cross reactivity — αποτελέσματα «Mutation Detected») με τη μετάλλαξη L747S του εξωνίου 19, μια σπάνια επίκτητη μετάλλαξη η οποία μπορεί να προσδώσει ανθεκτικότητα στη θεραπεία με TKI.¹⁹
13. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις ($> 10^5$ αντίγραφα/mL) ενδέχεται να δώσουν ψευδή αποτελέσματα.
14. Το **cobas** EGFR Test εγκρίθηκε για χρήση με 25 µL αρχικού DNA ανά βοθρίο αντίδρασης. Δεν συνιστώνται όγκοι αρχικού DNA εισαγωγής μικρότεροι από 25 µL ανά βύθισμα αντίδρασης.
15. Η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω πρέπει να ακολουθείται για την ανίχνευση ≥ 100 αντιγράφων μεταλλαγμένου DNA ανά mL πλάσματος διαχωρισμένου από αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA ή σε σωληνάριο K2 EDTA για τις μεταλλάξεις του EGFR που αναφέρει ο Πίνακας 3.
16. Δείγματα με αποτελέσματα τύπου «No Mutation Detected» μπορεί να φέρουν μεταλλάξεις του EGFR που δεν ανιχνεύονται από την ανάλυση.
17. Τυχόν αποτέλεσμα «No Mutation Detected» σε πλάσμα θα πρέπει να εξετάζεται ως προς το ενδεχόμενο συμπληρωματικής εξέτασης (reflex testing) ή επιβεβαίωσης με ιστολογική εξέταση.
18. Το πλάσμα που προέρχεται από ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA επαρκεί μόνο για μία εξέταση.
19. Δεν πρέπει να γίνεται συνδυασμός πλάσματος από αιμοληψίες ασθενών που δεν γίνονται την ίδια στιγμή.
20. Η απόδοση του **cobas** EGFR Test δεν έχει τεκμηριωθεί σε δείγματα με θρόμβους που συλλέγονται με το σωληνάριο Roche cfDNA. Τα δείγματα με θρόμβους πρέπει να απορρίπτονται και πρέπει να λαμβάνεται ένα νέο δείγμα από τον ασθενή.
21. Έχει παρατηρηθεί αιμόλυση σε πλάσμα διαχωρισμένο από αίμα που έχει συλλεχθεί στο σωληνάριο Roche cfDNA. Συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης σε $> 2,0$ g/L ενδέχεται να παρεμβαίνουν στην απόδοση του **cobas** EGFR Test.

Αξιολόγηση απόδοσης μη κλινικών δειγμάτων

Αναλυτική απόδοση

Τα ακόλουθα δεδομένα παρατίθενται για να καταδειχθεί η αναλυτική απόδοση του **cobas** EGFR Test.

Αναλυτική ευαισθησία — όριο τυφλού

Για να αξιολογηθεί η απόδοση του **cobas** EGFR Test απουσία προτύπου και να διασφαλιστεί ότι ένα τυφλό δείγμα δεν θα παράγει σήμα ανάλυσης που μπορεί να υποδηλώνει μετάλλαξη χαμηλής συγκέντρωσης, αξιολογήθηκαν δείγματα EGFR άγριου τύπου (wild-type) με K2 EDTA από πλάσμα υγιών δοτών. Με χρήση της ανάλυσης που περιγράφεται στην οδηγία CLSI EP17-A2²⁰, το όριο τυφλού βρέθηκε μηδενικό για όλες τις μεταλλάξεις.

Όριο ανίχνευσης με τη χρήση DNA κυτταρικής σειράς

Πλάσμα σε K2 EDTA

DNA κυτταρικής σειράς, που περιέχουν καθεμία από τις επτά κατηγορίες μεταλλάξεων που ανιχνεύονται από την εξέταση, προστέθηκαν σε δείγμα πλάσματος σε K2 EDTA από υγιή δότη, που ήταν άγριου τύπου (wild-type) για EGFR. Προετοιμάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις και εξετάστηκαν 24 αντίγραφα για κάθε στοιχείο του πίνακα, χρησιμοποιώντας καθεμία από τις τρεις παρτίδες kit **cobas** EGFR Test.

Ως όριο ανίχνευσης (LoD) για καθεμία από τις επτά κατηγορίες μεταλλάξεων που ανιχνεύονται από την εξέταση ορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση DNA που έδωσε ποσοστό αποτελεσμάτων «Mutation Detected» για τον EGFR τουλάχιστον 95% για τη στοχευμένη μετάλλαξη. Ο Πίνακας 24 παραθέτει τα αποτελέσματα.

Πίνακας 24 Όριο ανίχνευσης του cobas EGFR Test με πλάσμα σε K2 EDTA

Εξώνιο EGFR	Ομάδα Μεταλλάξεων EGFR	Αλληλουχία Νουκλεϊκού Οξέως EGFR	LoD ανέπαφου* DNA (αντίγραφα/mL)	LoD διατετμημένου** DNA (αντίγραφα/mL)	COSMIC ID ¹⁴
18	G719A	2156G>C	100	100	6239
19	Ex19Del	2235_2249del15	25	75	6223
20	T790M	2369C>T	25	100	6240
20	S768I	2303G>T	20	25	6241
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	80	25	12376
21	L858R	2573T>G	10	100	6224
21	L861Q	2582T>A	30	30	6213

Οι διαφορές στο παρατηρηθέν LoD οφείλονται στη διαφορά του DNA.

* Το DNA άθικτης κυτταρικής σειράς είχε WT DNA περίπου 10.000 αντίγραφα/mL.

** Το DNA κυτταρικής σειράς, διατετμημένο με μηχανικό τρόπο σε ένα μέσο μέγεθος 220 bp, είχε DNA WT περίπου 100.000 αντίγραφα/mL.

Πλάσμα σε Roche cfDNA

Για πλάσμα διαχωρισμένο από αίμα που έχει συλλεχθεί σε σωληνάριο Roche cfDNA, οι τιμές LoD επαληθεύτηκαν με την προσθήκη διατετμημένων DNA κυτταρικής σειράς, που περιέχουν καθεμία από τις επτά κατηγορίες μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν από την εξέταση σε πλάσμα υγιούς δότη σε Roche cfDNA, που ήταν άγριου τύπου (wild-type) για EGFR. Οι αραιώσεις παρασκευάστηκαν με στόχο τις συγκεντρώσεις LoD που υποδεικνύονται στον Πίνακα 24 και εξετάστηκαν 20 αντίγραφα για κάθε δείγμα με χρήση μίας παρτίδας kit **cobas** EGFR Test. Το ποσοστό επιτυχίας που παρατηρήθηκε για κάθε μετάλλαξη ήταν 100%.

Συνοπτικά, το **cobas** EGFR Test μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του EGFR με ≤ 100 αντίγραφα μεταλλαγμένου DNA ανά mL πλάσματος, με εισαγωγή του τυπικού όγκου των 25 μ L αρχικού DNA ανά βοθρίο αντίδρασης είτε χρησιμοποιώντας πλάσμα σε K2 EDTA είτε πλάσμα σε Roche cfDNA.

Διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες μεταλλάξεις των εξονίων 18, 19, 20 και 21

Δείγματα από την επέκταση της κλινικής δοκιμής AURA και την κλινική δοκιμή AURA2

Το **cobas** EGFR Test έδωσε αποτελέσματα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») για τις παρακάτω μεταλλάξεις του EGFR που παρατηρήθηκαν στα δείγματα της επέκτασης της κλινικής δοκιμής AURA και της κλινικής δοκιμής AURA2 (Πίνακας 25). Η μελέτη επέκτασης της AURA χρησιμοποιήθηκε για να συμπληρωθούν τα δείγματα της δοκιμής της AURA2 και να αυξηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης σπάνιων μεταλλάξεων στο πλάσμα. Η απόδοση ανάλυσης του **cobas** EGFR Test στην ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει αξιολογηθεί.

Πίνακας 25 Μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν στην επέκταση της AURA και στην AURA2, και εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση με το **cobas** EGFR Test

Εξόνιο	Αλληλουχία μετάλλαξης	Αλλαγή Αμινοξέος	COSMIC ID ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Δεν βρέθηκε
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Δεν βρέθηκε
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Δεν βρέθηκε

Ειδικότητα — μικροοργανισμός

Η ειδικότητα του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε μέσω εξέτασης για *Staphylococcus epidermidis* σε πληθυσμό 1×10^6 μονάδες σχηματισμού αποικιών, το οποίο δεν παρουσίασε διασταυρούμενη αντίδραση ή αλληλεπίδραση με το **cobas** EGFR Test, όταν προστέθηκε σε δείγματα πλάσματος υγιών δοτών με K2 EDTA που περιείχαν άγριου τύπου (wild-type) και μεταλλαγμένες αλληλουχίες EGFR.

Αλληλεπίδραση

Πλάσμα σε K2 EDTA

Αποδείχθηκε ότι τα τριγλυκερίδια (37 mM, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹), η χολερυθρίνη (μη συζευγμένη ή συζευγμένη, 0,2 g/L, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹) και η αιμοσφαιρίνη (1,5 g/L) δεν αλληλεπιδρούν με το **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης της δυνητικά παρεμβαλλόμενης ουσίας σε δείγματα πλάσματος υγιών δοτών με K2 EDTA που περιείχαν άγριου τύπου (wild-type) και μεταλλαγμένες αλληλουχίες EGFR. Αποδείχθηκε ότι η αιμοσφαιρίνη σε συγκέντρωση 2,0 g/L στο πλάσμα αλληλεπιδρά με το **cobas** EGFR Test. Αποδείχθηκε ότι η λευκωματίνη σε συγκέντρωση ≥ 60 g/L (60 g/L, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹) ενδέχεται να αλληλεπιδρά με το **cobas** EGFR Test.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι το EDTA, το Neupogen και το TARCEVA® δεν επηρεάζουν την απόδοση του **cobas** EGFR Test, κατόπιν προσθήκης της δυνητικά παρεμβαλλόμενης ουσίας σε δείγματα πλάσματος υγιών δοτών με K2 EDTA που περιείχαν άγριου τύπου (wild-type) και μεταλλαγμένες αλληλουχίες EGFR.

Πλάσμα σε Roche cfDNA

Τα τριγλυκερίδια (37 mM, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹), 0,2 g/L χολερυθρίνης (μη συζευγμένη ή συζευγμένη, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹), η αιμοσφαιρίνη (2,0 g/L) και η λευκωματίνη (60 g/L, υψηλή συγκέντρωση συνιστώμενη από το CLSI²¹) αποδείχθηκε ότι δεν παρεμβαίνουν στο **cobas** EGFR Test, όταν η δυνητικά παρεμβαλλόμενη ουσία προστέθηκε σε δείγματα που περιείχαν άγριου τύπου (wild-type) και μεταλλαγμένες αλληλουχίες EGFR σε πλάσμα σε Roche cfDNA υγιούς δότη.

ΓραμμικότηταΠλάσμα σε K2 EDTA

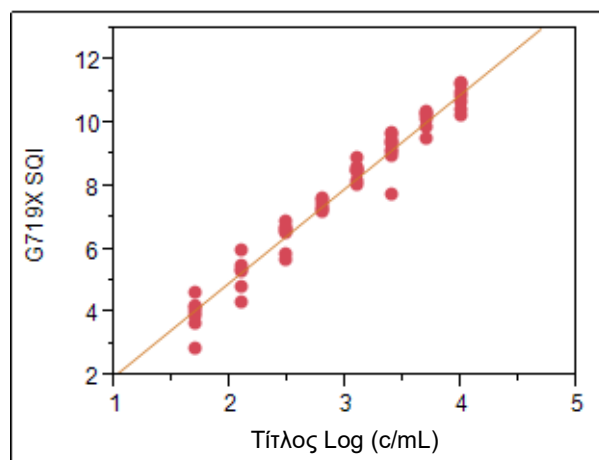
Η μελέτη γραμμικότητας του **cobas** EGFR Test διεξήχθη με σειρές αραιώσεων τουλάχιστον 8 στοιχείων του πίνακα, οι οποίες κάλυπταν το γραμμικό εύρος για την κυρίαρχη μετάλλαξη κάθε κατηγορίας μεταλλάξεων του EGFR που αναφέρεται από την εξέταση. Τα στοιχεία του πίνακα προετοιμάστηκαν με αραιώση DNA κυτταρικών σειρών που περιείχαν καθεμία από τις κυρίαρχες μεταλλάξεις σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA από υγιείς δότες, οι οποίες είναι άγριου τύπου (wild-type) για τον EGFR. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Οδηγία CLSI EP-06A.²⁴ Εξετάστηκαν δέκα αντίγραφα ανά στοιχείο πίνακα για κάθε 2 παρτίδες, για συγκεντρώσεις έως 1,0E+04 αντίγραφα/mL (συνολικά 20 αντίγραφα ανά επίπεδο). Για συγκεντρώσεις πάνω από 1,0E+04 αντίγραφα/mL, εξετάστηκε ένα αντίγραφο ανά παρτίδα.

Για κάθε κατηγορία μεταλλάξεων του **cobas** EGFR Test, ο Πίνακας 26 επισημαίνει το γραμμικό εύρος, ενώ το Σχήμα 8 έως το Σχήμα 14 απεικονίζει τα αντίστοιχα διαγράμματα για μία παρτίδα.

Πίνακας 26 Γραμμικό εύρος του cobas EGFR Test με πλάσμα σε K2 EDTA

Εξώνιο EGFR	Μετάλλαξη EGFR	Αλληλουχία — Στόχος Νουκλεϊκού Οξέως	Γραμμικό εύρος τιμών (αντίγραφα/mL)
18	G719A	2156G>C	50 – 1E+04
19	Έλλειψη στο Εξώνιο 19	2235_2249del15	10 – 1E+05
20	S768I	2303G>T	10 – 1E+05
20	T790M	2369C>T	50 – 1E+05
20	Ένθεση στο Εξώνιο 20	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10 – 1E+05
21	L858R	2573T>G	10 – 1E+05
21	L861Q	2582T>A	10 – 1E+05

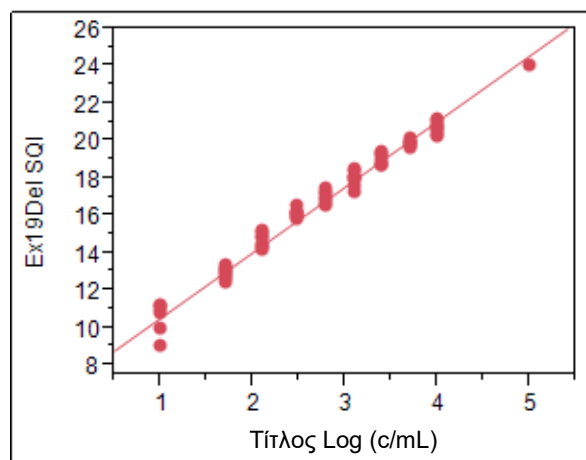
Σχήμα 8 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς G719A



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

$$R^2 = 0,968$$

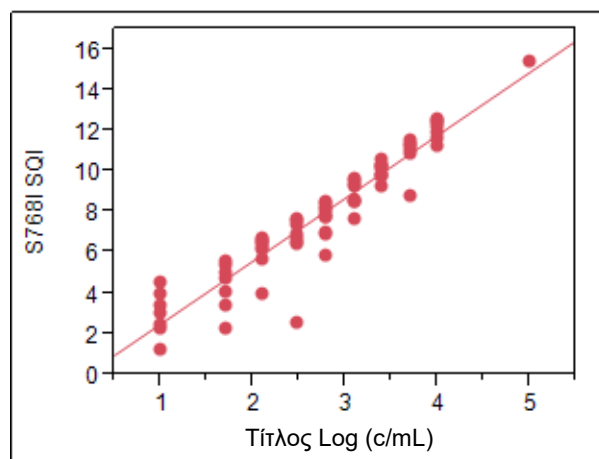
Σχήμα 9 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς Ex19 Del



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

$$R^2 = 0,981$$

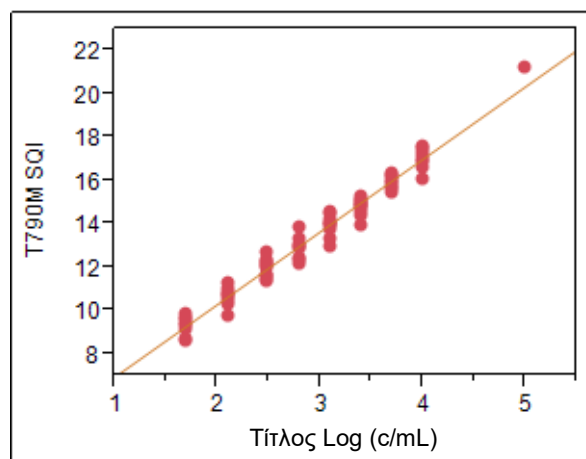
Σχήμα 10 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς S768I



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

$$R^2 = 0,912$$

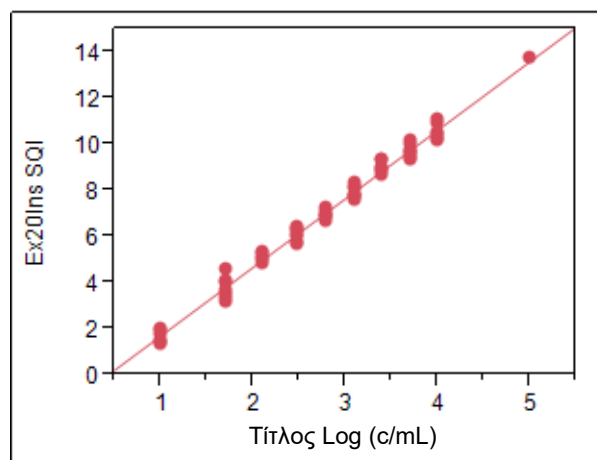
Σχήμα 11 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς T790M



$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \text{αντίγραφα log ανά mL}$$

$$R^2 = 0,973$$

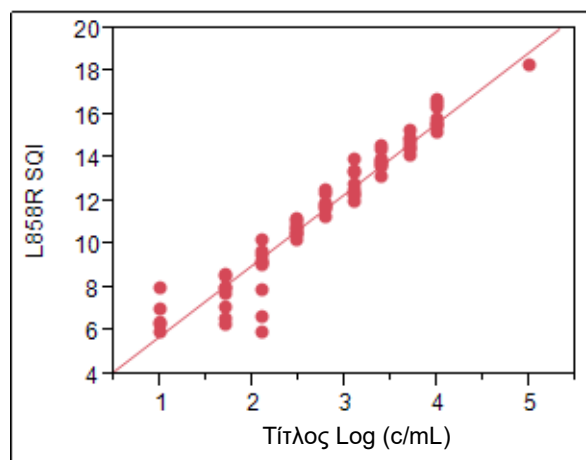
Σχήμα 12 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς Ex20Ins



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

$$R^2 = 0,990$$

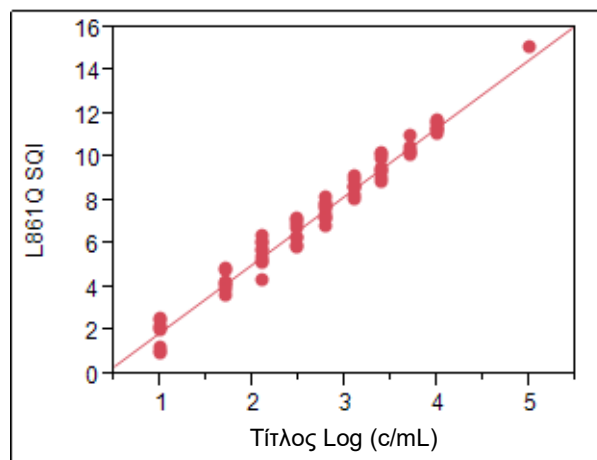
Σχήμα 13 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA κυτταρικής σειράς L858R



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

$$R^2 = 0,933$$

Σχήμα 14 Γραμμικότητα του μεταλλαγμένου DNA σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA: DNA γραμμικής σειράς L861Q



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

$$R^2 = 0,980$$

Πλάσμα σε Roche cfDNA

Το γραμμικό εύρος του πλάσματος σε Roche cfDNA επαληθεύτηκε με χρήση μιας σειράς αραιώσεων τουλάχιστον 6 στοιχείων του πίνακα, οι οποίες κάλυπταν το γραμμικό εύρος που είχε τεκμηριωθεί με δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA (Πίνακας 26). Τα στοιχεία του πίνακα παρασκευάστηκαν με αραιώση διατετημένου DNA κυτταρικής σειράς που περιείχε καθεμία από τις κυρίαρχες μεταλλάξεις σε πλάσμα σε Roche cfDNA υγιούς δότη, που ήταν άγριου τύπου (wild-type) για EGFR. Η αξιολόγηση διεξήχθη σύμφωνα με την οδηγία CLSI EP06-A.²⁴ Εξετάστηκαν τέσσερα αντίγραφα ανά στοιχείο πίνακα για κάθε 2 παρτίδες, σε συγκεντρώσεις έως 1,0E+04 αντίγραφα/mL (συνολικά 8 αντίγραφα ανά επίπεδο). Εξετάστηκαν πάνω από 1,0E+04 αντίγραφα/mL, 2 αντίγραφα ανά παρτίδα (συνολικά 4 αντίγραφα ανά επίπεδο).

Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε με τη χρήση ενός συνόλου δώδεκα δειγμάτων που περιλάμβαναν αραιωμένο DNA μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών EGFR μέσα σε δείγματα πλάσματος υγιών δοτών με K2 EDTA. Οι κυρίαρχες μεταλλάξεις για καθεμία από τις κατηγορίες που αναφέρονται από την εξέταση υπεβλήθησαν σε συνδυαστική αραιώση σε 11 δείγματα και αξιολογήθηκαν σε συγκέντρωση το τριπλάσιο του αντίστοιχου LoD κάθε μετάλλαξης (σε αντίγραφα/mL), 1,0E+03 αντίγραφα/mL και 5,0E+04 αντίγραφα/mL. Επιπλέον, εξετάστηκε ένα δείγμα άγριου τύπου (wild-type). Καθένα από τα 12 δείγματα εξετάστηκε εις διπλούν από δύο χειριστές, με χρήση δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων σε διάστημα 4 ημερών, σε δύο αναλυτές **cobas® z 480** (N = 32 ανά δείγμα). Το **cobas** EGFR Test παρουσίασε ποσοστό σωστού εντοπισμού μεταλλάξεων 99,2% (381/384).

Ο Πίνακας 27 αναφέρει τον μέσο SQI και τη SQI SD που προέκυψαν από τη μελέτη επαναληψιμότητας. Και τα 32 αντίγραφα για το δείγμα άγριου τύπου (wild-type) έδωσαν το αναμενόμενο αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μεταλλάξεων («No Mutation Detected»).

Πίνακας 27 Μέσος SQI και SQI SD από τη μελέτη επαναληψιμότητας

Εξώνιο EGFR	Μετάλλαξη EGFR	Αλληλουχία — Στόχος Νουκλεϊκού Οξέως	Συγκέντρωση (αντίγραφα/mL)	Μέσος SQI	SD SQI (n = 32)
18	G719A	2156G>C	3,00E+02	4,53	0,41
			1,00E+03	6,86	0,38
			5,00E+04	11,81	0,67
19	Ex19Del	2235_2249del15	7,50E+01	13,42	0,46
			1,00E+03	16,85	0,42
			5,00E+04	22,31	0,55
20	S768I	2303G>T	6,00E+01	5,99	0,45
			1,00E+03	8,49	0,43
			5,00E+04	14,13	0,43
20	T790M	2369C>T	7,50E+01	9,00	1,03
			1,00E+03	13,28	0,43
			5,00E+04	19,52	0,57
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	2,40E+02	4,92	0,43
			1,00E+03	6,77	0,40
			5,00E+04	12,61	0,60
21	L858R	2573T>G	1,20E+02	9,81	0,47
			1,00E+03	12,91	0,28
			5,00E+04	17,21	0,81
21	L861Q	2582T>A	4,50E+01	3,58	0,73
			1,00E+03	7,91	0,45
			5,00E+04	10,06	0,60
EGFR άγριου τύπου (wild-type)			0	NMD	NMD

«NMD» = δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη («No Mutation Detected»)

Αξιολόγηση της κλινικής απόδοσης

Κλινική αναπαραγωγιμότητα με πλάσμα σε K2 EDTA

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας του **cobas** EGFR Test σε 3 κέντρα εξέτασης (2 εξωτερικά και 1 εσωτερικό, 2 χειριστές ανά κέντρο), 3 παρτίδες αντιδραστηρίων και 3 μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης, με έναν πίνακα εννέα στοιχείων με τεχνητά δείγματα που περιλάμβαναν DNA κυτταρικής σειράς αραιωμένο σε πλάσμα ασθενών με NSCLC. Οι μεταλλάξεις, οι οποίες περιλάμβαναν μία μετάλλαξη G719X στο εξόνιο 18, μία μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19, δύο μεταλλάξεις T790M στο εξόνιο 20, μία μετάλλαξη ένθεσης στο εξόνιο 20, μία μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21 και μία μετάλλαξη L861Q στο εξόνιο 21, αντιπροσωπεύονταν σε τέσσερα τεχνητά δείγματα, όπως συνοψίζει ο Πίνακας 28. Κάθε τεχνητό δείγμα προετοιμάστηκε σε δύο επίπεδα: περίπου 100 αντίγραφα/mL και 300 αντίγραφα/mL. Αυτά τα τεχνητά δείγματα αναπτύχθηκαν σε οκτώ διαφορετικά στοιχεία του πίνακα, μαζί με έναν ορό ελέγχου άγριου τύπου, προκειμένου να απαρτίσουν τον πίνακα εννέα στοιχείων.

Πίνακας 28 Συνδυασμοί μεταλλάξεων τεχνητών δειγμάτων

Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 1	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 2	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 3	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 4
Έλλειψη στο εξόνιο 19	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Ένθεση στο εξόνιο 20

Συνολικά εκτελέστηκαν 37 αναλύσεις, με 36 έγκυρες αναλύσεις και μία μη έγκυρη ανάλυση. Εξετάστηκαν συνολικά 648 πίνακες (ή 1224 μεταλλάξεις), εκ των οποίων 646 πίνακες (ή 1220 μεταλλάξεις) είχαν έγκυρα αποτελέσματα. Δεν υπήρχαν αποτελέσματα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») σε 72 έγκυρες εξετάσεις των στοιχείων άγριου τύπου του πίνακα, δίνοντας συμφωνία σε ποσοστό 100%. Τα ποσοστά συμφωνίας ποικίλλουν για τα στοιχεία μετάλλαξης: οκτώ πέτυχαν 100% συμφωνία, πέντε > 97% και μία μετάλλαξη (G719X) παρουσίασε χαμηλότερη συμφωνία, σε ποσοστό περίπου 90%. Ο Πίνακας 29 παρουσιάζει τα αποτελέσματα ως προς τη συνολική συμφωνία κατά μετάλλαξη. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) ήταν $\leq 12,8\%$ για όλα τα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα. Για τον εσωτερικό ορό ελέγχου και τον ορό ελέγχου μετάλλαξης, ο συνολικός CV ήταν $\leq 1,5\%$. Ο CV ήταν $\leq 0,89\%$ μεταξύ παρτίδων και $\leq 1,47\%$ εντός της ίδιας παρτίδας.

Πίνακας 29 Συνολικές εκτιμήσεις συμφωνίας κατά στοιχείο μετάλλαξης στη μελέτη επαναληψιμότητας

Στοιχείο μετάλλαξης	Αριθμός έγκυρων εξετάσεων	N συμφωνίας	Ποσοστό συμφωνίας (95% CI) ^α
Άγριου τύπου (WT) – NA	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 18, G719A – 100 αντίγραφα/mL	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^β
Έλλειψη στο εξώνιο 19 (2235_2249del15) – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ένθεση στο εξώνιο 20 (2307_2308ins9) – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, S768I – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, T790M – 100 αντίγραφα/mL	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
Εξώνιο 21, L858R – 100 αντίγραφα/mL	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Εξώνιο 21, L861Q – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 18, G719A – 300 αντίγραφα/mL	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Έλλειψη στο εξώνιο 19 (2235_2249del15) – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ένθεση στο εξώνιο 20 (2307_2308ins9) – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, S768I – 300 αντίγραφα/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Εξώνιο 20, T790M – 300 αντίγραφα/mL	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
Εξώνιο 21, L858R – 300 αντίγραφα/mL	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Εξώνιο 21, L861Q – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)

^α 95% CI = 95% ακριβές διωνυμικό διάστημα εμπιστοσύνης.

^β Η χαμηλότερη συμφωνία για αυτό το δείγμα οφειλόταν κυρίως στους πολλαπλούς απωλεσθέντες προσδιορισμούς (n = 6/24 συνδυασμοί αντιγράφων) που σημειώθηκαν κυρίως στο ένα από τα τρία κέντρα.

Σημείωση: Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία όταν ένα στοιχείο μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») ή όταν ένα στοιχείο άγριου τύπου (wild-type) του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μεταλλάξεων («No Mutation Detected»).

Σημείωση: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη αποτελούνταν από DNA κυτταρικής σειράς, διατεταγμένο με μηχανικό τρόπο σε ένα μέσο μέγεθος 220 bp, με υπόβαθρο DNA WT περίπου 12.000 αντίγραφα/mL.

Κλινική αναπαραγωγισιμότητα με πλάσμα σε Roche cfDNA

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγισιμότητας του **cobas** EGFR Test σε 3 κέντρα εξέτασης (2 εξωτερικά και 1 εσωτερικό, 2 χειριστές ανά κέντρο), μία παρτίδα αντιδραστηρίων και 3 μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης, με τρεις πίνακες εννέα στοιχείων με τεχνητά δείγματα που περιελάμβαναν DNA κυτταρικής σειράς αραιωμένο σε τρεις μοναδικές δεξαμενές πλάσματος υγιούς δότη. Τα δείγματα κάθε δεξαμενής συλλέχθηκαν με μια μοναδική παρτίδα σωληναρίων Roche cfDNA. Δύο από τους πίνακες πλάσματος εξετάστηκαν σε κάθε εργαστήριο. Οι μεταλλάξεις, οι οποίες περιελάμβαναν μία μετάλλαξη G719X στο εξώνιο 18, μία μετάλλαξη έλλειψης στο εξώνιο 19, μία μετάλλαξη T790M στο εξώνιο 20, μία μετάλλαξη ένθεσης στο εξώνιο 20, μία μετάλλαξη L858R στο εξώνιο 21 και μία μετάλλαξη L861Q στο εξώνιο 21, αντιπροσωπεύονταν σε τέσσερα τεχνητά δείγματα, όπως συνοψίζει ο Πίνακας 30. Κάθε τεχνητό δείγμα προετοιμάστηκε σε δύο επίπεδα: περίπου 100 αντίγραφα/mL και 300 αντίγραφα/mL. Αυτά τα τεχνητά δείγματα αναπτύχθηκαν σε οκτώ διαφορετικά στοιχεία του πίνακα, μαζί με έναν ορό ελέγχου άγριου τύπου, προκειμένου να απαρτίσουν τον πίνακα εννέα στοιχείων.

Πίνακας 30 Συνδυασμοί μεταλλάξεων τεχνητών δειγμάτων

Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 1	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 2	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 3	Συνδυασμός DNA κυτταρικής σειράς 4
Έλλειψη στο εξώνιο 19	S768I	T790M	L858R
Ένθεση στο εξώνιο 20	G719A	L861Q	δ/ι

Συνολικά εκτελέστηκαν 36 αναλύσεις και όλες ήταν έγκυρες. Εξετάστηκαν συνολικά 648 πίνακες, εκ των οποίων 646 πίνακες (ή 1220 μεταλλάξεις) είχαν έγκυρα αποτελέσματα. Υπήρξε ένα αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») σε 72 έγκυρες εξετάσεις των στοιχείων άγριου τύπου (wild-type) του πίνακα, δίνοντας συμφωνία σε ποσοστό 98,6%. Οι συμφωνίες διαφέρουν για τα στοιχεία μετάλλαξης: 100% συμφωνία επιτεύχθηκε σε δεκατρείς, > 98% συμφωνία επιτεύχθηκε σε μία. Ο Πίνακας 31 παρουσιάζει τα αποτελέσματα ως προς τη συνολική συμφωνία κατά μετάλλαξη. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) ήταν $\leq 13,7\%$ για όλα τα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα. Για τον εσωτερικό ορό ελέγχου και τον ορό ελέγχου μετάλλαξης, ο συνολικός CV ήταν $\leq 1,3\%$.

Πίνακας 31 Συνολικές εκτιμήσεις συμφωνίας κατά στοιχείο μετάλλαξης στη μελέτη επαναληψιμότητας

Στοιχείο μετάλλαξης	Αριθμός έγκυρων εξετάσεων	N συμφωνίας	Ποσοστό συμφωνίας (95% CI) ^a
Άγριου τύπου (WT) – NA	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Εξώνιο 18, G719A – 100 αντίγραφα/mL	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Έλλειψη στο εξώνιο 19 (2235_2249del15) – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Ένθεση στο εξώνιο 20 (2307_2308ins9) – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, S768I – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, T790M – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 21, L858R – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 21, L861Q – 100 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 18, G719A – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Έλλειψη στο εξώνιο 19 (2235_2249del15) – 300 αντίγραφα/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Ένθεση στο εξώνιο 20 (2307_2308ins9) – 300 αντίγραφα/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Εξώνιο 20, S768I – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 20, T790M – 300 αντίγραφα/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)
Εξώνιο 21, L858R – 300 αντίγραφα/mL	72	72	100 (95,0, 100,0)
Εξώνιο 21, L861Q – 300 αντίγραφα/mL	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a 95% CI = 95% ακριβές διωνυμικό διάστημα εμπιστοσύνης.

Σημείωση: Τα αποτελέσματα ήταν σε συμφωνία όταν ένα στοιχείο μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») ή όταν ένα στοιχείο άγριου τύπου (WT) του πίνακα έδινε έγκυρο αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μεταλλάξεων («No Mutation Detected»).

Όριο ανίχνευσης (LoD) με χρήση δειγμάτων πλάσματος από ασθενείς με NSCLC

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη προκειμένου να επιβεβαιωθεί το LoD με δείγματα πλάσματος NSCLC με K2 EDTA για τρεις ελλείψεις στο εξόνιο 19, μία μετάλλαξη L858R και μία μετάλλαξη T790M, με χρήση του **cobas** EGFR Test σε τρία κέντρα εξέτασης (δύο εξωτερικά και ένα εσωτερικό, δύο χειριστές ανά κέντρο), τρεις παρτίδες αντιδραστηρίων και δύο μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης, με έναν πίνακα 11 στοιχείων με δείγματα πλάσματος NSCLC (πέντε μεταλλάξεις το καθένα με δύο επίπεδα: $1 \times \text{LoD}$ και $2 \times \text{LoD}$, συν WT). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 αναλύσεις (δύο αντίγραφα ανά ανάλυση) και όλες οι αναλύσεις ήταν έγκυρες. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 264 εξετάσεις με τα 11 στοιχεία πίνακα, εκ των οποίων 262 (99,2%) εξετάσεις ήταν έγκυρες. Δεν υπήρχαν αποτελέσματα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») σε 23 έγκυρες εξετάσεις των στοιχείων άγριου τύπου του πίνακα, δίνοντας συμφωνία σε ποσοστό 100%. Το ποσοστό συμφωνίας για τη μετάλλαξη T790M-1 στο εξόνιο 20 $\times \text{LoD}$ είναι 95,8%, ενώ για όλα τα άλλα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα είναι 100%. Ο Πίνακας 32 συνοψίζει τις εκτιμήσεις συμφωνίας ανά στοιχείο του πίνακα. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) ήταν $< 7,0\%$ για όλα τα στοιχεία μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα.

Πίνακας 32 Εκτιμήσεις συμφωνίας ανά στοιχείο πίνακα

Στοιχείο πίνακα	Αριθμός έγκυρων εξετάσεων	N συμφωνίας	Ποσοστό συμφωνίας (95% CI) ^a
Άγριου τύπου (WT) – NA	23	23	100 (85,2, 100,0)
Έλλειψη 1 στο εξόνιο 19 – $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Έλλειψη 1 στο εξόνιο 19 – $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Έλλειψη 2 στο εξόνιο 19 – $1 \times \text{LoD}$	23	23	100 (85,2, 100,0)
Έλλειψη 2 στο εξόνιο 19 – $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Έλλειψη 3 στο εξόνιο 19 – $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Έλλειψη 3 στο εξόνιο 19 – $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Εξόνιο 20, T790M – $1 \times \text{LoD}$	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
Εξόνιο 20, T790M – $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Εξόνιο 21, L858R – $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Εξόνιο 21, L858R – $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a 95% CI = 95% ακριβές διωνυμικό διάστημα εμπιστοσύνης.

Σημείωση: Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία όταν μια έγκυρη εξέταση για ένα στοιχείο μεταλλαγμένου τύπου του πίνακα δίνει αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») ή όταν μια έγκυρη εξέταση για ένα στοιχείο άγριου τύπου (wild-type) του πίνακα δίνει αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μετάλλαξης («No Mutation Detected»).

Σημείωση: Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη είχαν υπόβαθρο WT DNA περίπου 24.000 αντίγραφα/mL.

Συσχέτιση πλάσματος σε Roche cfDNA με πλάσμα σε K2 EDTA

Η απόδοση του **cobas** EGFR test με πλάσμα σε K2 EDTA και με πλάσμα σε Roche cfDNA συγκρίθηκε με την εξέταση ενός δείγματος του πίνακα που περιελάμβανε ζεύγη αιμοληψιών από 34 ασθενείς NSCLC άγριου τύπου (wild-type) EGFR, 17 ασθενείς NSCLC θετικούς για μετάλλαξη EGFR και 20 υγιείς δότες. Οι αιμοληψίες υγιούς δότη χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή υποκατάστατων δειγμάτων που αποτελούνται από διατετημένο DNA κυτταρικής σειράς που περιέχει τις κυρίαρχες μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν από το **cobas** EGFR test, το οποίο προστέθηκε σε ολικό αίμα που λήφθηκε μέσα σε σωληνάρια K2 EDTA και Roche cfDNA. Το επίπεδο εξωγενούς προσθήκης για το διατετημένο DNA κυτταρικής σειράς στα υποκατάστατα δείγματα ήταν περίπου $1,5 \times \text{LoD}$ για κάθε μετάλλαξη, όπως προσδιορίστηκε με το πλάσμα σε K2 EDTA (Πίνακας 24). Η κατάσταση μετάλλαξης επιβεβαιώθηκε για κάθε ασθενή με NSCLC με τη χρήση μιας μεθόδου NGS. Κάθε δείγμα εξετάστηκε με μία παρτίδα αντιδραστηρίων **cobas** EGFR Test. Όλα τα δείγματα έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα και τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στον Πίνακα 33.

Πίνακας 33 Ανάλυση συμφωνίας μεταξύ πλάσματος σε K2 EDTA και πλάσματος που προέρχεται από το σωληνάριο Roche cfDNA

		Σωληγνάριο K2 EDTA		
		MD	NMD	Σύνολο
Roche σωληγνάριο ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος DNA	MD	37	0	37
	NMD	0	34	34
	Σύνολο	37	34	71

Ποσοστό συμφωνίας θετικών (%): 95% CI	100% 90,5–100%
Ποσοστό συμφωνίας αρνητικών (%): 95% CI	100% 89,7–100%
Συνολική συμφωνία (%): 95% CI	100% 94,5–100%

Όπου: MD = Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη («Mutation Detected») και NMD = Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη («No Mutation Detected»)

Η συμφωνία μεταξύ ζευγών δειγμάτων για πλάσμα σε K2 EDTA και πλάσμα που προέρχεται από τα Roche σωληνάρια συλλογής ελεύθερου κυττάρων κυκλοφορούντος DNA ήταν 100%. Δεν παρατηρήθηκαν ασύμφωνα αποτελέσματα.

Σε δείγματα πλάσματος από τη μελέτη, το **cobas** EGFR Test ανίχνευσε τις παρακάτω μεταλλάξεις στο εξόνιο 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου EGFR. Ο Πίνακας 34 παραθέτει αυτές τις μεταλλάξεις. Εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά, οι μεταλλάξεις παρατηρήθηκαν σε δείγματα NSCLC.

Πίνακας 34 Μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν σε συσχέτιση πλάσματος σε Roche cfDNA με πλάσμα σε K2 EDTA

Εξόνιο	Αλληλουχία μετάλλαξης	Αλλαγή Αμινοξέος	COSMIC ID ¹⁴
18	2156G>C*	G719A	6239
	2155G>A§	G719S	6252
19	2235_2249del15 ⁺	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15§	E746_A750delELREA	6225
	2219_2236dup TTCCCGTCGCTATCAAGG§	K745_E746insVPVAIK	6963938
	2237_2248del12§	E746_E749delELRE	Δεν βρέθηκε
	2237_2251del15§	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC§	L747P	24267
	2251A>C§	T751P	Δεν βρέθηκε
20	2369C>T*	T790M	6240
	2303G>T*	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G*	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Παρατηρήθηκε μόνο σε υποκατάστατο δείγμα

⁺ Παρατηρήθηκε σε υποκατάστατο δείγμα και σε δείγμα NSCLC

§ Παρατηρήθηκε μόνο σε δείγμα NSCLC

Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων πλάσματος φάσης III από τη δοκιμή ASPIRATION

Η αναλυτική ορθότητα του **cobas** EGFR Test στην ανίχνευση των μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης με μια επικυρωμένη πλατφόρμα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), με χρήση δειγμάτων πλάσματος σε K2 EDTA από ασθενείς με προχωρημένο NSCLC από μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες μελέτες (δοκιμή ASPIRATION): Κλινικές μελέτες G027821 (MetMab) και G027761 (MetLung) της Genentech, σε συνδυασμό με την κλινική μελέτη ML25637 (ASPIRATION) της Roche.

Στην ανάλυση συμφωνίας για τις μεταλλάξεις έλλειψης στο εξόνιο 19 ή τις μεταλλάξεις L858R του EGFR συμπεριλήφθηκαν 128 δείγματα πλάσματος, με όγκο 2 mL και έγκυρα αποτελέσματα κατά ζεύγη τόσο από το **cobas** EGFR Test στο πλάσμα όσο και από μια μέθοδο NGS στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος. Συνολικά 32 δείγματα είχαν αποτελέσματα MD και 95 είχαν αποτελέσματα NMD με τη μέθοδο NGS. Η τιμή PPA μεταξύ του **cobas** EGFR Test στο πλάσμα και της μεθόδου NGS στο πλάσμα ήταν 87,5% (95% CI: 71,9% έως 95,0%). Η τιμή NPA μεταξύ του **cobas** EGFR Test και της μεθόδου NGS ήταν 96,8% (95% CI: 91,1% έως 98,9%), όπως παρουσιάζει ο Πίνακας 35.

Πίνακας 35 Σύγκριση του **cobas** EGFR Test στο πλάσμα με τη μέθοδο NGS για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 ή μεταλλάξεων L858R του EGFR

Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	87,5% (28/32)	71,9%, 95,0%
Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	96,8% (92/95)	91,1%, 98,9%

Συσχετισμός μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και ιστού με χρήση του **cobas** EGFR Test για την ανίχνευση των μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R σε δείγματα φάσης III από τη δοκιμή ENSURE

Η μελέτη ENSURE (YO25121) ήταν μια πολυκεντρική, ανοικτής ετικέτας, τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του TARCEVA® (ερλοτινίμπη) έναντι του συνδυασμού γεμισταβίνης/σιπλατίνης ως θεραπείας πρώτης γραμμής για ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) σταδίου IIIB/IV, των οποίων οι όγκοι έφεραν μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19 ή μετάλλαξη L858R στο τμήμα τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Συνολικά εξετάστηκαν 647 ασθενείς, από τους οποίους 601 ασθενείς έλαβαν έγκυρο αποτέλεσμα EGFR ιστού για τη μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19 και τη μετάλλαξη L858R από το **cobas** EGFR Test και 217 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στη μελέτη.

Πεντακόσιοι δεκαεπτά ασθενείς (86,0%, 517/601) είχαν αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA και δείγματα ιστού και 441 ασθενείς είχαν όγκο δείγματος πλάσματος $\geq 2,0$ mL, δηλ. τον όγκο δείγματος για τον οποίο έχει επικυρωθεί η χρήση του **cobas** EGFR Test στο πλάσμα.

Ο συσχετισμός των δειγμάτων πλάσματος και ιστού με χρήση του **cobas** EGFR Test για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R αξιολογήθηκε τόσο συγκεντρωτικά όσο και χωριστά. Στην ανάλυση συμφωνίας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 431 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα κατά ζεύγη τόσο από δείγματα ιστού όσο και από δείγματα πλάσματος με χρήση του **cobas** EGFR Test. Η ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA) μεταξύ των δειγμάτων πλάσματος και ιστού ήταν 76,7% (95% CI: 70,5% έως 81,9%) και η ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA) ήταν 98,2% (95% CI: 95,4% έως 99,3%), για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R συγκεντρωτικά, όπως δείχνει ο Πίνακας 36. Ο Πίνακας 36 παρουσιάζει επίσης τις τιμές PPA, NPA και OPA για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R ξεχωριστά.

Πίνακας 36 Συμφωνία μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και δειγμάτων ιστού με χρήση του cobas EGFR Test για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R

Μετάλλαξη	Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Συγκεντρωτικά	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	76,7% (161/210)	70,5%, 81,9%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	98,2% (217/221)	95,4%, 99,3%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	87,7% (378/431)	84,2%, 90,5%
Έλλειψη στο Εξόνιο 19	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	80,8% (97/120)	72,9%, 86,9%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	98,7% (307/311)	96,7%, 99,5%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	93,7% (404/431)	91,0%, 95,7%
L858R	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	67,8% (61/90)	57,6%, 76,5%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	99,1% (338/341)	97,4%, 99,7%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	92,6% (399/431)	89,7%, 94,7%

Σημείωση: Για τον υπολογισμό των τιμών PPA και NPA χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά ο ιστός.

Η θετική προγνωστική αξία (PPV) και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) για την ανίχνευση μεταλλάξεων έλλειψης στο εξόνιο 19 και της μετάλλαξης L858R συγκεντρωτικά υπολογίστηκαν επίσης με χρήση της μεθόδου bootstrap, βάσει του διαφορετικού επιπολασμού μεταλλάξεων στον ιστό του πληθυσμού (Πίνακας 37). Όπως ήταν αναμενόμενο, η PPV αυξάνεται και η NPV μειώνεται καθώς ο επιπολασμός των μεταλλάξεων του EGFR αυξάνεται. Για έναν πληθυσμό καυκάσιων ασθενών, που σημαίνει επιπολασμό μεταλλάξεων του EGFR ιστού 10–15%, η PPV κυμαίνεται από 82,8% έως 88,6% ενώ η NPV κυμαίνεται από 96,0% έως 97,4%. Η PPV κυμαίνεται από 94,8% έως 97,8% ενώ η NPV κυμαίνεται από 80,8% έως 90,9% εάν η μέθοδος βασίζεται στον επιπολασμό σε έναν ασιατικό πληθυσμό, που σημαίνει επιπολασμό μεταλλάξεων του EGFR ιστού 30–50%.

Πίνακας 37 Εκτιμώμενη προγνωστική αξία του cobas EGFR Test στον ιστό και του cobas EGFR Test στο πλάσμα (ασθενείς με όγκο δείγματος πλάσματος ≥ 2,0 mL) βάσει του διαφορετικού επιπολασμού των μεταλλάξεων του EGFR στον ιστό

Θεωρούμενος επιπολασμός μεταλλάξεων του EGFR βάσει δειγμάτων ιστού	Θετική προγνωστική αξία (PPV)	Αρνητική προγνωστική αξία (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%)

Σημείωση: Τα 95% CI υπολογίστηκαν μέσω της μεθόδου bootstrap.

Σημείωση: Τα αποτελέσματα 79 δειγμάτων με όγκο < 2,0 mL αντιμετωπίστηκαν ως μη έγκυρα σε αυτήν την ανάλυση.

Σημείωση: Για τον υπολογισμό των τιμών PPV και NPV χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά το πλάσμα.

Συσχέτιση με τη μέθοδο αναφοράς με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2

Η κλινική απόδοση του **cobas** EGFR Test αξιολογήθηκε μέσω σύγκρισης με μια επικυρωμένη πλατφόρμα αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS), με χρήση δειγμάτων πλάσματος σε K2 EDTA από ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε εξέταση διαλογής στη δοκιμή φάσης II AURA2 για το TAGRISSO®.²³

Από τους 383 κατάλληλους ασθενείς, 344 ασθενείς είχαν διαθέσιμο δείγμα πλάσματος και εξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test, με 342 έγκυρα αποτελέσματα και δύο μη έγκυρα αποτελέσματα. Από συνολικά 344 δείγματα πλάσματος που εξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test, 322 (93,6%) εξετάστηκαν επίσης με μια μέθοδο NGS και 22 δεν είχαν επαρκή όγκο πλάσματος για να ελεγχθούν με την NGS.

Αξιολογήθηκε η αναλυτική ορθότητα του **cobas** EGFR Test σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς, την NGS, για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M σε δείγματα πλάσματος. Στην ανάλυση συμφωνίας συμπεριλήφθηκαν συνολικά 320 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα κατά ζεύγη που προέκυψαν από το **cobas** EGFR Test και τη μέθοδο NGS. Η ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA) μεταξύ του **cobas** EGFR Test και της μεθόδου NGS ήταν 91,5% (95% CI: 85,7% έως 95,1%) και η ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA) ήταν 91,1% (95% CI: 86,0% έως 94,4%) για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M, όπως δείχνει ο Πίνακας 38.

Πίνακας 38 Σύγκριση του cobas EGFR Test στο πλάσμα με τη μέθοδο NGS για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M του EGFR

Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	91,5% (129/141)	85,7%, 95,1%
Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	91,1% (163/179)	86,0%, 94,4%

Σε δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA από τη δοκιμή AURA2, το **cobas** EGFR Test ανίχνευσε μεταλλάξεις στο εξώνιο 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου EGFR. Ο Πίνακας 39 παραθέτει αυτές τις μεταλλάξεις.

Πίνακας 39 Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν από το cobas EGFR Test στη δοκιμή AURA2

Εξώνιο	Αλληλουχία μετάλλαξης	Αλλαγή Αμινοξέος	COSMIC ID ¹⁴
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Δεν βρέθηκε
	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	Δεν βρέθηκε
	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	Δεν βρέθηκε
	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

Συσχετισμός μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και ιστού για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M με χρήση δειγμάτων φάσης II από τη δοκιμή AURA2

Η κλινική δοκιμή AURA2²³ ήταν μια φάσης II, ανοικτής ετικέτας, ενός σκέλους μελέτη, η οποία αξιολόγησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του TAGRISSO® (οσιμερτινίμπη) ως θεραπείας δεύτερης ή ≥ τρίτης γραμμής σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, οι οποίοι είχαν εμφανίσει εξέλιξη της νόσου μετά από προηγούμενη θεραπεία με εγκεκριμένο παράγοντα EGFR TKI και ήταν T790M-θετικοί βάσει του **cobas** EGFR Test. Συνολικά εξετάστηκαν 472 ασθενείς, 383 ασθενείς είχαν δείγμα ιστού που εξετάστηκε και 371 ασθενείς είχαν έγκυρο αποτέλεσμα EGFR ιστού για τη μετάλλαξη T790M από το **cobas** EGFR Test, εκ των οποίων 233 ασθενείς ήταν T790M-θετικοί και 210 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στη μελέτη.

Από τους 383 κατάλληλους ασθενείς, 344 ασθενείς είχαν δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν συνολικά 334 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα κατά ζεύγη τόσο από δείγματα ιστού όσο και από δείγματα πλάσματος με χρήση του **cobas** EGFR Test. Η ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA) μεταξύ των δειγμάτων πλάσματος και ιστού ήταν 58,7% (95% CI: 52,2% έως 65,0%) και η ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA) ήταν 80,2% (95% CI: 71,8% έως 86,5%) για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M. Η θετική προγνωστική αξία (PPV) ήταν 85,6% (95% CI: 79,2% έως 90,3%) και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) ήταν 49,2% (95% CI: 42,0% έως 56,4%) για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M, όπως δείχνει ο Πίνακας 40.

Η τιμή PPV που παρουσιάζεται στον Πίνακα 40 επηρεάστηκε από τα 22 δείγματα που ήταν T790M-αρνητικά βάσει του **cobas** EGFR Test στον ιστό και T790M-θετικά βάσει του **cobas** EGFR Test στο πλάσμα. Δεκαοκτώ δείγματα επιβεβαιώθηκε ότι ήταν T790M-θετικά μέσω της μεθόδου NGS στο πλάσμα και ένα δείγμα δεν είχε επαρκή όγκο για εξέταση NGS. Μόνο τρία δείγματα βρέθηκαν T790M-αρνητικά μέσω της μεθόδου NGS.

Πίνακας 40 Συμφωνία μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και δειγμάτων ιστού με χρήση του cobas EGFR Test για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M

Μετάλλαξη	Μέτρηση συμφωνίας	Ποσοστιαία συμφωνία (N)	95% CI
T790M	Ποσοστιαία συμφωνία θετικών αποτελεσμάτων (PPA)	58,7% (131/223)	52,2%, 65,0%
	Ποσοστιαία συμφωνία αρνητικών αποτελεσμάτων (NPA)	80,2% (89/111)	71,8%, 86,5%
	Συνολική ποσοστιαία συμφωνία (OPA)	65,9% (220/334)	60,6%, 70,8%
	Θετική προγνωστική αξία (PPV)	85,6% (131/153)	79,2%, 90,3%
	Αρνητική προγνωστική αξία (NPV)	49,2% (89/181)	42,0%, 56,4%

Σημείωση: Για τον υπολογισμό των τιμών PPA και NPA χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά ο ιστός.

Σημείωση: Για τον υπολογισμό των τιμών PPV και NPV χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά το πλάσμα.

Η συμφωνία μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και ιστού στην ανίχνευση της μετάλλαξης ανθεκτικότητας T790M είναι χαμηλότερη από ό,τι για τις μεταλλάξεις ενεργοποίησης. Η τιμή PPA μπορεί να επηρεαστεί από την ετερογένεια στους ιστούς: αντίθετα από τις ενεργοποιητικές μεταλλάξεις L858R και τις μεταλλάξεις ελλείψεων στο εξόνιο 19, η μετάλλαξη T790M ενδέχεται να είναι παρούσα σε μικρό ποσοστό κυττάρων του όγκου και είναι γενικά μια επίκτητη μετάλλαξη. Συνεπώς, cfDNA με μετάλλαξη T790M μπορεί να υπάρχει μόνο σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο πλάσμα και κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης. Η τιμή NPA μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την ετερογένεια στους ιστούς: επειδή η μετάλλαξη T790M μπορεί να μην είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα του όγκου, ενδέχεται να ληφθεί βιοψία ιστού από ένα τμήμα του όγκου στο οποίο δεν είναι παρούσα η μετάλλαξη T790M, ενώ άλλα σημεία του όγκου μπορεί να είναι T790M-θετικά.⁷

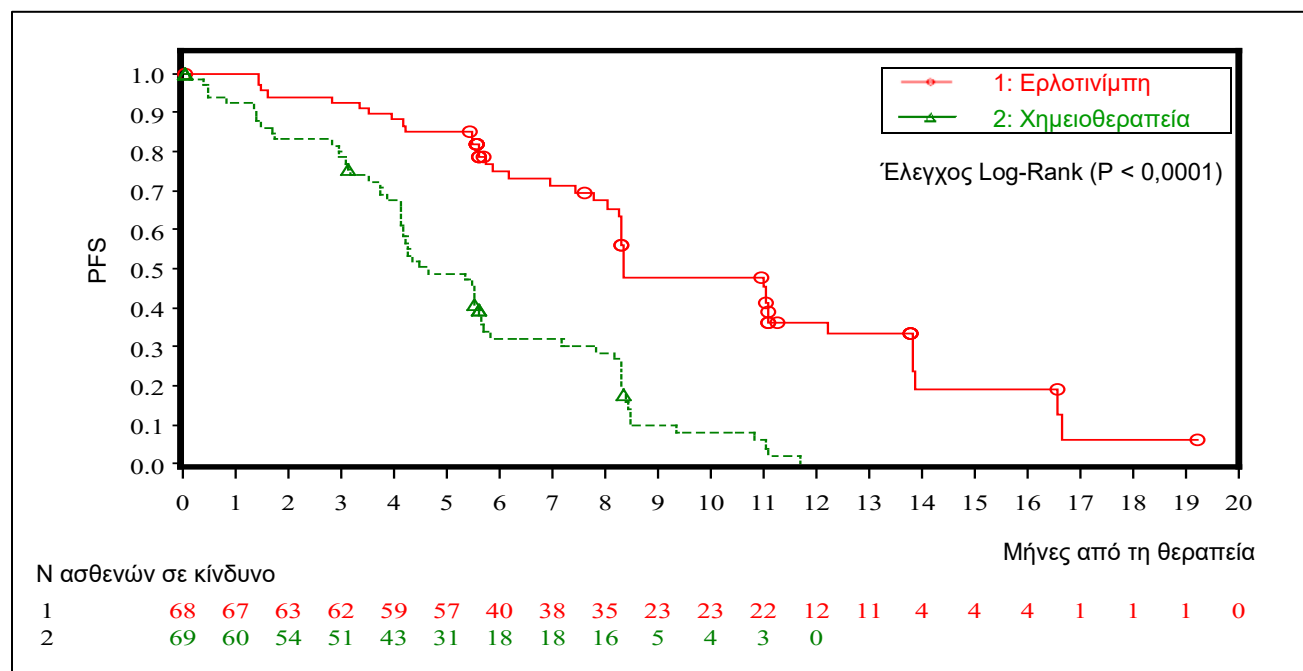
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων

ENSURE

Στη δοκιμή ENSURE, από τους 217 ασθενείς που εντάχθηκαν (δηλ. αυτούς στους οποίους ανιχνεύθηκε έλλειψη στο εξόνιο 19 ή μετάλλαξη L858R σε δείγμα ιστού μέσω του **cobas** EGFR Test v1), 214 ασθενείς (98,6%) είχαν διαθέσιμο δείγμα πλάσματος σε K2 EDTA και 180 ασθενείς είχαν όγκο δείγματος πλάσματος 2,0 mL. Από τα 180 δείγματα πλάσματος με όγκο 2 mL που εξετάστηκαν με το **cobas** EGFR Test, 137 δείγματα είχαν αποτέλεσμα ανίχνευσης μετάλλαξης («Mutation Detected») για έλλειψη στο εξόνιο 19 ή για μετάλλαξη L858R (68 ασθενείς στο σκέλος της ερλοτινίμπης, 69 ασθενείς στο σκέλος της χημειοθεραπείας), 42 δείγματα είχαν αποτέλεσμα μη ανίχνευσης μετάλλαξης («No Mutation Detected») (22 ασθενείς στο σκέλος του TARCEVA®, 20 ασθενείς στο σκέλος της χημειοθεραπείας) και ένα δείγμα παρείχε μη έγκυρο αποτέλεσμα. Στο Σχήμα 15, για τους ασθενείς με έλλειψη στο εξόνιο 19 ή με μετάλλαξη L858R σε δείγμα πλάσματος παρουσιάζονται οι καμπύλες Kaplan-Meier για την αξιολογηθείσα από τον ερευνητή PFS. Οι ασθενείς στο σκέλος του TARCEVA® είχαν μεγαλύτερη PFS σε σύγκριση με τους ασθενείς στο σκέλος της χημειοθεραπείας και οι δύο καμπύλες διαχωρίστηκαν καλά στην πορεία της περιόδου παρατήρησης (τιμή $p < 0,001$), 07340761001-08EL

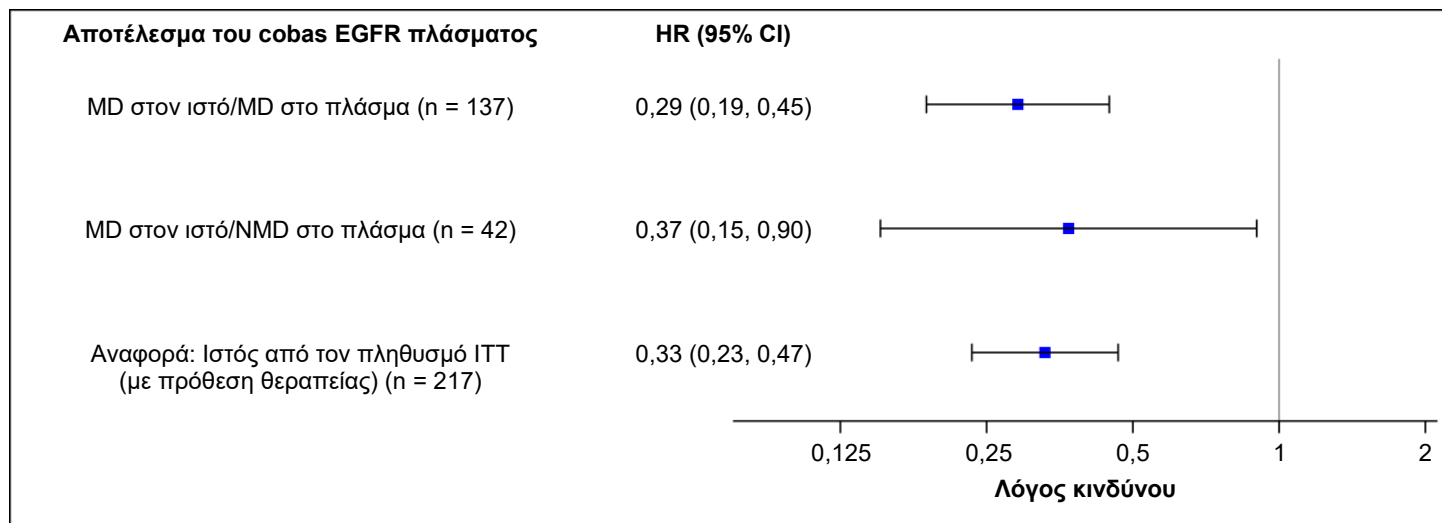
καταδεικνύοντας μεγάλο όφελος από τη θεραπεία με TARCEVA® στους ασθενείς με ανιχνεύσιμη ενεργοποιητική μετάλλαξη του EGFR στο πλάσμα.

Σχήμα 15 Διάγραμμα Kaplan-Meier της PFS κατά θεραπεία, για τους ασθενείς στους οποίους ανιχνεύτηκε μετάλλαξη μέσω του cobas EGFR Test τόσο στο πλάσμα όσο και στον ιστό (αξιολόγηση ερευνητή) (με δείγματα πλάσματος 2 mL)



Παρατηρήθηκε σταθερό όφελος ως προς την PFS για όλους τους ασθενείς που ήταν θετικοί σε μετάλλαξη του EGFR ιστού και είχαν όγκο δείγματος πλάσματος 2,0 mL, ανεξάρτητα από το αν το πλάσμα τους ήταν θετικό ή αρνητικό σε μετάλλαξη, και το όφελος αυτό ήταν παρόμοιο με το όφελος που παρατηρήθηκε ως προς την PFS στον συνολικό πληθυσμό ITT της δοκιμής ENSURE (HR = 0,33, 95% CI: 0,23 έως 0,47), όπως φαίνεται στο Σχήμα 16 παρακάτω.

Σχήμα 16 Διάγραμμα Forest για τους HR για την PFS βάσει αξιολόγησης του ερευνητή (με δείγματα πλάσματος 2 mL)



Σημείωση: MD = ανιχνεύτηκε μετάλλαξη («Mutation Detected») (έλλειψη στο εξώνιο 19 ή L858R), NMD = δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη («No Mutation Detected») (έλλειψη στο εξώνιο 19 και L858R)

AURA2

Η κύρια μεταβλητή τελικού σημείου της αποτελεσματικότητας ήταν το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) σύμφωνα με τα RECIST 1.1 βάσει BICR με χρήση του συνόλου ανάλυσης ασθενών αξιολογήσιμων για ανταπόκριση (ERAS). Το ORR ορίστηκε ως ο αριθμός (%) ασθενών που είχαν τουλάχιστον μία επίσκεψη και αποτέλεσμα πλήρους ανταπόκρισης (CR) ή μερικής ανταπόκρισης (PR) το οποίο επιβεβαιώθηκε τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες αργότερα (δηλ., ως βέλτιστη αντικειμενική ανταπόκριση [BOR] είχαν CR ή PR).

Στον πληθυσμό του συνόλου ανάλυσης ασθενών αξιολογήσιμων για ανταπόκριση (ERAS) βάσει του ιστού (T790M+ ασθενείς βάσει του **cobas** EGFR Test στον ιστό οι οποίοι έλαβαν τουλάχιστον μία δόση TAGRISSO® και είχαν μετρήσιμη νόσο κατά την περίοδο αναφοράς σύμφωνα με την BICR), 111 ασθενείς είχαν T790M+ πλάσμα σε K2 EDTA βάσει του **cobas** EGFR Test (δηλ. T790M+ τόσο στα δείγματα ιστού όσο και στα δείγματα πλάσματος). Το ORR για αυτό το υποσύνολο ήταν 64,9% (72/111, 95% CI: 52,1% έως 70,4%), το οποίο είναι πολύ παρόμοιο με το ORR (64,1%) που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό ERAS ιστού.

Στον πληθυσμό του πλήρους συνόλου ανάλυσης (FAS) ιστού (T790M+ ασθενείς βάσει του **cobas** EGFR Test στον ιστό οι οποίοι έλαβαν τουλάχιστον μία δόση TAGRISSO®), 117 ασθενείς είχαν T790M+ πλάσμα βάσει του **cobas** EGFR Test. Το ORR για τους ασθενείς με αποτέλεσμα T790M+ τόσο στα δείγματα ιστού όσο και στα δείγματα πλάσματος ήταν 61,5% (72/117, 95% CI: 55,2% έως 73,7%), το οποίο είναι επίσης πολύ όμοιο με το ORR (61%) που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό FAS ιστού. Ο Πίνακας 41 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών. Δεδομένου ότι η ένταξη στη δοκιμή AURA2 βασίστηκε σε θετικά αποτελέσματα εξέτασης ιστού, δεν είναι διαθέσιμα τα δεδομένα έκβασης για τους ασθενείς (με T790M+ πλάσμα, με T790M- ιστό) από αυτήν τη δοκιμή.

Πίνακας 41 Ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης ανά αποτέλεσμα πλάσματος στους ασθενείς που εντάχθηκαν (T790M+ ιστός) στη μελέτη AURA2

Πληθυσμός (T790M+ δείγμα ιστού)	Αποτελέσματα του cobas EGFR Test από δείγμα πλάσματος	N	Αριθμός ασθενών με ανταπόκριση (ORR) ^a n(%)	ORR (95% CI)
Πλήρες σύνολο ανάλυσης ιστού (FAS ιστού)	T790M+ (FAS πλάσματος)	117	72 (61,5%)	(55,2%, 73,7%)
	T790M-	89	53 (59,6%)	(51,3%, 73,0%)
	Σύνολο (FAS ιστού)	210	128 (61,0%)	(57,0%, 70,8%)
Σύνολο ανάλυσης ασθενών αξιολογήσιμων για ανταπόκριση βάσει του ιστού (ERAS ιστού)	T790M+ (ERAS πλάσματος)	111	72 (64,9%)	(52,1%, 70,4%)
	T790M-	83	52 (62,7%)	(48,6%, 69,8%)
	Σύνολο (ERAS ιστού)	198	127 (64,1%)	(54,0%, 67,6%)

^a Στις ανταποκρίσεις περιλαμβάνονται μόνο οι επιβεβαιωμένες ανταποκρίσεις.

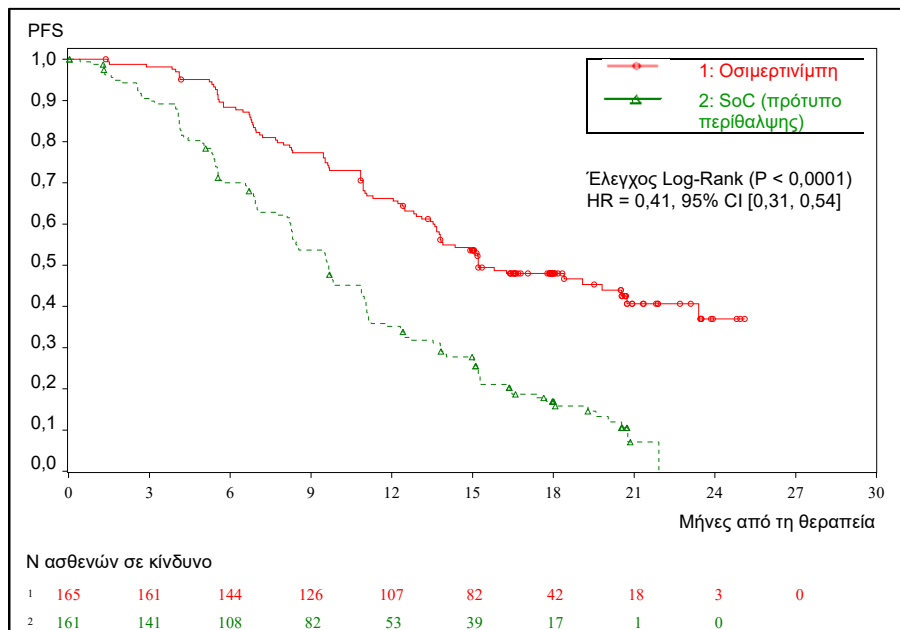
FLAURA

I. Δοκιμή φάσης III για το TAGRISSO® ως θεραπεία πρώτης γραμμής

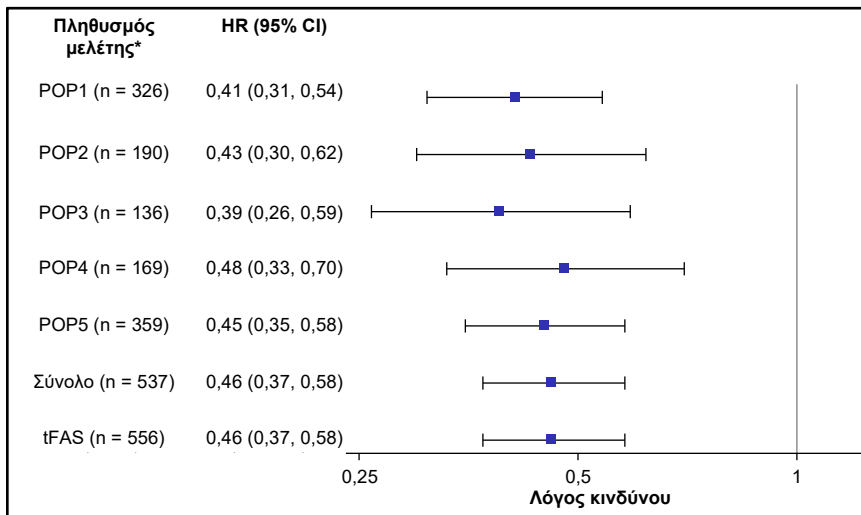
Συνολικά 994 υποβλήθηκαν σε εξέταση διαλογής στη μελέτη FLAURA¹⁰ εκ των οποίων 556 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στην κλινική μελέτη και 438 αποκλείστηκαν κατά τη διαλογή. Από τους 556 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν στη μελέτη FLAURA, 537 ήταν κατάλληλοι για την ανάλυση της μελέτης. Από τους 537 ασθενείς που ήταν κατάλληλοι για τη μελέτη, 276 τυχαιοποιήθηκαν βάσει κεντρικής εξέτασης ιστού **cobas** EGFR, για 254 εκ των οποίων υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα πλάσματος σε K2 EDTA για εξέταση, εκ των οποίων 190 βρέθηκαν θετικά στην εξέταση πλάσματος **cobas** EGFR (pEGFRm+), συνολικά 261 τυχαιοποιήθηκαν βάσει τοπικής εξέτασης ιστού, για 242 εκ των οποίων, υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα πλάσματος για εξέταση, εκ των οποίων 169 βρέθηκαν θετικά στην εξέταση πλάσματος **cobas** EGFR (136 θετικά σε μετάλλαξη του EGFR (tEGFRm+) βάσει **cobas**, 1 αρνητικό σε μετάλλαξη του EGFR (tEGFRm-) βάσει **cobas** και 32 δείγματα έδωσαν μη έγκυρα αποτελέσματα ή δεν υποβλήθηκαν στην εξέταση ιστού **cobas**).

Για τον κύριο πληθυσμό δειγμάτων πλάσματος (tEGFRm+ και pEGFRm+ βάσει του cobas EGFR Test, N = 326, 190 που τυχαιοποιήθηκαν κεντρικά και 136 που τυχαιοποιήθηκαν τοπικά], το HR ήταν 0,41 (95% CI: 0,31, 0,54) και το HR για το FAS της μελέτης FLAURA (tEGFRm+, N = 556) ήταν 0,46 (95% CI: 0,37, 0,58). Επομένως, η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου για τον κύριο πληθυσμό δειγμάτων πλάσματος συμφωνεί με τα αποτελέσματα του πληθυσμού FAS της μελέτης FLAURA. Το διάγραμμα Kaplan-Meier για τον κύριο πληθυσμό δειγμάτων πλάσματος με μετάλλαξη έλλειψης στο εξόνιο 19 ή μετάλλαξη L858R σε δείγματα πλάσματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 17.

Σχήμα 17 Διάγραμμα Kaplan-Meier της PFS ανά θεραπεία για τον πληθυσμό δειγμάτων πλάσματος της μελέτης FLAURA (ασθενείς με αποτελέσματα tEGFRm+ και pEGFRm+ στην εξέταση cobas, n = 326)



Η υπεροχή του TAGRISSO® έναντι του προτύπου περιθάλψης είναι συνεπής σε όλες τις υποομάδες θετικών δειγμάτων πλάσματος, όπως αυτά ορίστηκαν από την κατάσταση εγγραφής tEGFR βάσει τοπικών εξετάσεων και της εξέτασης **cobas**, με HR που κυμαίνονται από 0,39 έως 0,48 και συμφωνούν με τις τιμές HR που προέκυψαν από τον πληθυσμό FAS της μελέτης FLAURA (HR = 0,46) όπως φαίνονται παρακάτω στο Σχήμα 18.

Σχήμα 18 Διάγραμμα Forest τιμών HR για τις υποομάδες της μελέτης FLAURA που ορίστηκαν από την κατάσταση εξέτασης EGFR βάσει τοπικών εξετάσεων και της κεντρικής εξέτασης cobas

POP = Πληθυσμός (υποομάδα).

* POP1: Όλοι οι τυχαίοι ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση ιστού **cobas** και την εξέταση πλάσματος **cobas**.

POP2: Ασθενείς που τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει εξέτασης ιστού **cobas** και είχαν επίσης θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος **cobas**.

POP3: Ασθενείς που τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει τοπικής εξέτασης ιστού και είχαν επίσης θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις ιστού και πλάσματος **cobas**.

POP4: Ασθενείς που τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει τοπικής εξέτασης ιστού και είχαν επίσης θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος **cobas**.

POP5: Όλοι οι τυχαίοι ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος **cobas**.

Συνολικά: Όλοι οι τυχαίοι ασθενείς, εξαιρουμένων 19 ασθενών από την Κίνα.

tFAS: Όλοι οι τυχαίοι ασθενείς (πλήρες σύνολο ανάλυσης της μελέτης FLAURA).

II. Ανάλυση προτύπου περίθαλψης για το IRESSA®

Διενεργήθηκε μια ξεχωριστή ανάλυση για τους ασθενείς από το σκέλος προτύπου περίθαλψης (SoC) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® (γεφιτινίμη). Από όλους τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® και εμφάνισαν αντικειμενική ανταπόκριση σύμφωνα με αξιολόγηση ερευνητή στη μελέτη FLAURA, 105 ασθενείς έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος **cobas** από δείγματα σε K2 EDTA. Το ORR για όλους τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος **cobas** ήταν 71,4% (75/105, 95% CI: 62,2%, 79,2%, POP4 στον Πίνακα 42).

Από τους 105 με θετικά αποτελέσματα στην εξέταση πλάσματος **cobas**, 47 ασθενείς τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει της εξέτασης ιστού **cobas** (κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας για την εξέταση πλάσματος **cobas**) και 58 ασθενείς τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει τοπικής εξέτασης. Συνολικά 36 ασθενείς θεωρήθηκε ότι παρουσίασαν ανταπόκριση σύμφωνα με την αξιολόγηση του ερευνητή στον κύριο πληθυσμό αποτελεσματικότητας για την εξέταση πλάσματος **cobas** (n = 47), επομένως η τιμή ORR που προκύπτει είναι 76,6% (95% CI: 62,8%, 86,4%, POP1 στον Πίνακα 42).

Το ORR ήταν 62,2% (28/45, 95% CI: 47,6%, 74,9%) για τους ασθενείς που τυχαίοι εξετάστηκαν βάσει τοπικής εξέτασης και έλαβαν θετικό αποτέλεσμα τόσο στην εξέταση ιστού **cobas** όσο και στην εξέταση πλάσματος **cobas** (POP2 στον Πίνακα 42). Το ORR ήταν 69,6% (64/92, 95% CI: 59,5%, 78,0%) για όλους τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® και έλαβαν θετικό αποτέλεσμα τόσο στην εξέταση ιστού **cobas** όσο και στην εξέταση πλάσματος **cobas** (POP3 στον Πίνακα 42). Ένα διάγραμμα Forest των τιμών ORR για αυτούς τους διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών παρουσιάζεται στο Σχήμα 19. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το θεραπευτικό αποτέλεσμα του IRESSA®, βάσει της εξέτασης πλάσματος **cobas**, διατηρήθηκε σε όλους τους υποπληθυσμούς και παρουσίαζε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν στην αρχική μελέτη καταγραφής (IFUM) για τους ασθενείς που επιλέχθηκαν για το IRESSA®.¹³

Πίνακας 42 Τιμές ORR για ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με IRESSA® και έλαβαν θετικό αποτέλεσμα στην εξέταση πλάσματος cobas στη μελέτη FLAURA

Αντικειμενική ανταπόκριση	Ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα εξέτασης πλάσματος (pEGFR+) στο σκέλος προτύπου περίθαλψης που έλαβαν θεραπεία με IRESSA®				
	Κεντρικά τυχαιοποιημένοι pEGFR+ (tEGFR+ βάσει cobas)	Τοπικά τυχαιοποιημένοι pEGFR+ (tEGFR+ βάσει τοπικής εξέτασης)			Σύνολο
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Μη έγκυρα/ Χωρίς εξέταση	
Αρ. ασθενών	47	45	1	12	105
Ανταπόκριση	36	28	1	10	75
Χωρίς ανταπόκριση	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%)		-	-	-

Σημείωση: tEGFR = EGFR ιστού, pEGFR = EGFR πλάσματος, CI = (τιμή) διάστημα εμπιστοσύνης.

POP = Πληθυσμός (υποομάδα).

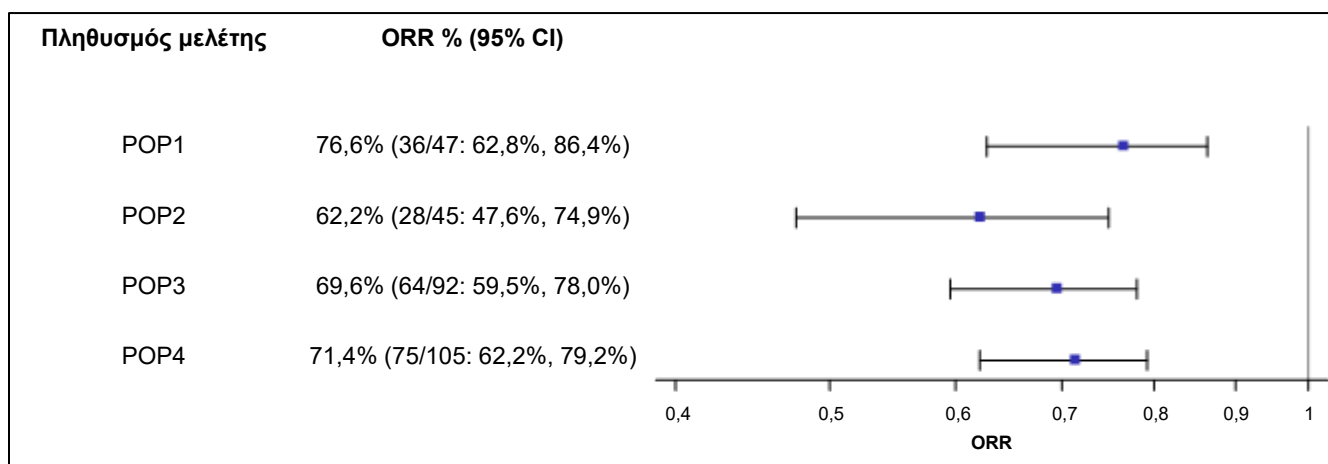
POP1: ORR για ασθενείς pEGFR+ βάσει **cobas** τυχαιοποιημένους βάσει εξέτασης ιστού **cobas** (κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας για την εξέταση πλάσματος **cobas**).

POP2: ORR για ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος και ιστού **cobas** που τυχαιοποιήθηκαν βάσει τοπικής εξέτασης ιστού.

POP3: ORR για όλους τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος και ιστού **cobas**.

POP4: ORR για όλους τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος **cobas**.

Σχήμα 19 Διαγράμματα Forest των ORR βάσει του cobas EGFR Test σε δείγματα πλάσματος για διαφορετικούς πληθυσμούς



POP = Πληθυσμός (υποομάδα).

POP1: ORR για ασθενείς pEGFR+ βάσει **cobas** τυχαιοποιημένους βάσει εξέτασης ιστού **cobas** (κύριος πληθυσμός αποτελεσματικότητας για την εξέταση πλάσματος **cobas**).

POP2: ORR για ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος και ιστού **cobas** που τυχαιοποιήθηκαν βάσει τοπικής εξέτασης ιστού.

POP3: ORR για όλους τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος και ιστού **cobas**.

POP4: ORR για όλους τους ασθενείς με θετικό αποτέλεσμα στις εξετάσεις πλάσματος **cobas**.

Ενδείξεις αποτελεσμάτων

Εξήγηση ενδείξεων αποτελεσμάτων

Η πηγή των ενδείξεων υποδεικνύεται από τον κωδικό ένδειξης. Οι κωδικοί περιγράφονται στον Πίνακας 43.

Πίνακας 43 Πηγή ένδειξης

Αρχικό γράμμα κωδικού ένδειξης	Πηγή ένδειξης	Παράδειγμα
M ^a	Πολλαπλές ή άλλες αιτίες	M6
R	Ερμηνεία αποτελεσμάτων	R20
Z ^a	Analyzer	Z1

^a Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χειριστή του συστήματος **cobas® 4800** ή στη Βοήθεια Χρήστη του συστήματος **cobas® 4800**

Στον Πίνακας 44 αναγράφονται όλες οι ενδείξεις αποτελεσμάτων του συστήματος που αφορούν τον χρήστη.

Πίνακας 44 Λίστα ενδείξεων ερμηνείας αποτελεσμάτων

Κωδικός επισήμανσης	Βαρύτητα	Περιγραφή	Συνιστώμενη ενέργεια
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε κανένας στόχος	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι προέκυψε αρνητικό αποτέλεσμα για το δείγμα (δηλ. το δείγμα ενδέχεται να μην προστέθηκε σε ένα ή περισσότερα βυθίσματα).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε Ορός ελέγχου μετάλλαξης	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι ο αλγόριθμος προσδιορισμού καμπής αντιμετώπισε κάποιο σφάλμα που ενδέχεται να οφείλεται σε μη τυπικό ή ακανόνιστο μοτίβο φθορισμού.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε Ορός ελέγχου μετάλλαξης	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι προέκυψε αρνητικό αποτέλεσμα για τον Ορό ελέγχου μετάλλαξης. (Ενδέχεται να μην προστέθηκε DNA Ορού ελέγχου μετάλλαξης σε ένα ή περισσότερα βυθίσματα.)
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Σφάλμα	Ο Ορός ελέγχου μετάλλαξης βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι μια τιμή Ct που παρατηρήθηκε για τον Ορό ελέγχου μετάλλαξης είναι υψηλότερη από την καθορισμένη τιμή κατωφλίου (δηλ. η καμπή είναι υπερβολικά υψηλή). Πιθανές αιτίες: 1. Εσφαλμένη προετοιμασία του κύριου μίγματος εργασίας. 2. Σφάλμα στη διοχέτευση με πιπέτα κατά την προσθήκη κύριου μίγματος εργασίας σε κάποιο βύθισμα της πλάκας μικροβυθισμάτων. 3. Σφάλμα στη διοχέτευση με πιπέτα κατά την προσθήκη ορού ελέγχου μετάλλαξης σε κάποιο βύθισμα της πλάκας μικροβυθισμάτων.
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Σφάλμα	Ο Ορός ελέγχου μετάλλαξης βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι μια τιμή Ct που παρατηρήθηκε για τον Ορό ελέγχου μετάλλαξης είναι κατώτερη από την καθορισμένη τιμή κατωφλίου (δηλ. η καμπή είναι υπερβολικά χαμηλή). Αυτό το σφάλμα ενδέχεται να προκύψει σε περίπτωση μόλυνσης από DNA.

Κωδικός επισήμανσης	Βαρύτητα	Περιγραφή	Συνιστώμενη ενέργεια
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε αρνητικός ορός ελέγχου	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι ο αλγόριθμος προσδιορισμού καμπίς αντιμετώπισε κάποιο σφάλμα που ενδέχεται να οφείλεται σε μη τυπικό ή ακανόνιστο μοτίβο φθορισμού.
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Σφάλμα	Ο αρνητικός ορός ελέγχου βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την ανάλυση. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι προέκυψε θετικό αποτέλεσμα για τον αρνητικό ορό ελέγχου (δηλ. ότι προέκυψε μόλυνση).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε κανένας στόχος	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι ο αλγόριθμος προσδιορισμού καμπίς αντιμετώπισε κάποιο σφάλμα που ενδέχεται να οφείλεται σε μη τυπικό ή ακανόνιστο μοτίβο φθορισμού.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Σφάλμα	Το αποτέλεσμα βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι παρατηρήθηκε ασυνήθιστα χαμηλή τιμή Ct για το δείγμα.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Σφάλμα	Το αποτέλεσμα βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι για το συγκεκριμένο δείγμα παρατηρήθηκε μη τυπική σχέση μεταξύ της τιμής Ct του Ορού ελέγχου μετάλλαξης και της τιμής Ct του εσωτερικού Ορού ελέγχου.
R811, R831, R851	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε εσωτερικός Ορός ελέγχου	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι ο αλγόριθμος προσδιορισμού καμπίς αντιμετώπισε κάποιο σφάλμα που ενδέχεται να οφείλεται σε μη τυπικό ή ακανόνιστο μοτίβο φθορισμού.
R812, R832, R852	Σφάλμα	Δεν ανιχνεύτηκε εσωτερικός Ορός ελέγχου	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι το αποτέλεσμα εσωτερικού Ορού ελέγχου για αυτό το δείγμα δεν ήταν έγκυρο. Η απουσία έγκυρου αποτελέσματος εσωτερικού Ορού ελέγχου υποδεικνύει: 1. Χαμηλής ποιότητας γονιδιωματικό DNA από το δείγμα 2. Ανεπαρκή επεξεργασία του δείγματος 3. Παρουσία αναστολέων της PCR στο δείγμα 4. Σπάνιες μεταλλάξεις εντός των περιοχών του γονιδιωματικού DNA που καλύπτονται από τους εκκινητές ή/και τους ιχνηθέτες εσωτερικού Ορού ελέγχου 5. Ότι το δείγμα DNA ενδέχεται να μην έχει προστεθεί σε ένα ή περισσότερα βυθίσματα 6. Άλλους παράγοντες.

Κωδικός επισήμανσης	Βαρύτητα	Περιγραφή	Συνιστώμενη ενέργεια
R813, R834, R853	Σφάλμα	Ο εσωτερικός Ορός ελέγχου βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι το αποτέλεσμα εσωτερικού Ορού ελέγχου για αυτό το δείγμα δεν ήταν έγκυρο. Η απουσία έγκυρου αποτελέσματος εσωτερικού Ορού ελέγχου υποδεικνύει: 1. Χαμηλής ποιότητας γονιδιωματικό DNA από το δείγμα 2. Ανεπαρκή επεξεργασία του δείγματος 3. Παρουσία αναστολέων της PCR στο δείγμα 4. Σπάνιες μεταλλάξεις εντός των περιοχών του γονιδιωματικού DNA που καλύπτονται από τους εκκινητές ή/και τους ιχνηθέτες εσωτερικού Ορού ελέγχου 5. Ότι το δείγμα DNA ενδέχεται να μην έχει προστεθεί σε ένα ή περισσότερα βυθίσματα 6. Άλλους παράγοντες.
R814, R835, R854	Σφάλμα	Ο εσωτερικός Ορός ελέγχου βρίσκεται εκτός εύρους	Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Ανατρέξτε στην ενότητα Διαδικασία εξέτασης . Αυτοί οι κωδικοί ένδειξης υποδεικνύουν ότι παρατηρήθηκε ασυνήθιστα χαμηλή τιμή Ct εσωτερικού Ορού ελέγχου για το δείγμα. Αυτό το σφάλμα ενδέχεται να προκύψει αν το μίγμα PCR περιέχει υπερβολική ποσότητα συμπυκνωμένου γονιδιωματικού DNA.

Πρόσθετες πληροφορίες Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των διαγνωστικών προϊόντων PCR της Roche.

Πίνακας 45 Σύμβολα που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των διαγνωστικών προϊόντων PCR της Roche

Age/DOB Ηλικία ή ημερομηνία γέννησης	 Ιατροτεχνολογικό προϊόν για εξέταση εκτός του χώρου παροχής φροντίδας	QS IU/PCR IU του QS ανά αντίδραση PCR. Χρησιμοποιήστε τις διεθνείς μονάδες (IU) του QS ανά αντίδραση PCR κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.
 Βοηθητικό Λογισμικό	 Μη αυτοδιαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν	SN Σειριακός αριθμός
Assigned Range [copies/mL] Αποδιδόμενο εύρος (αντίγραφα/mL)	 Διανομέας (Σημείωση: Η χώρα/περιοχή για την οποία ισχύει μπορεί να καθορίζεται κάτω από το σύμβολο.)	Site Τοποθεσία
Assigned Range [IU/mL] Αποδιδόμενο εύρος (IU/mL)	 Μην επαναχρησιμοποιείτε	Procedure Standard Πρότυπη Διαδικασία
EC REP Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα	 Γυναίκες	STERILE EO Αποστειρωμένο με αιθυλενοξείδιο
BARCODE Δελτίο Δεδομένων Γραμμοτού Κώδικα	 Μόνο για αξιολόγηση απόδοσης IVD	 Αποθηκεύστε σε σκοτεινό χώρο
LOT Κωδικός παρτίδας	GTIN Διεθνής Κωδικός Μονάδας Εμπορίας	 Περιορισμός θερμοκρασίας
 Βιολογικοί κίνδυνοι	 Εισαγωγέας	 Αρχείο Ορισμού Εξέτασης
REF Αριθμός καταλόγου	IVD <i>In vitro</i> Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	 Επάνω πλευρά
 Σήμανση συμμόρφωσης CE. Αυτό το ιατροτεχνολογικό προϊόν συμμορφώνεται με τις ισχύουσες απαιτήσεις σήμανσης CE των <i>in vitro</i> διαγνωστικών ιατροτεχνολογικών προϊόντων	LLR Κατώτατο Όριο Αποδιδόμενου Εύρους	Procedure UltraSensitive Διαδικασία UltraSensitive
Collect Date Ημερομηνία συλλογής	 Άνδρες	UDI Αποκλειστική ταυτοποίηση ιατροτεχνολογικού προϊόντος
 Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	 Κατασκευαστής	ULR Ανώτατο Όριο Αποδιδόμενου Εύρους
 Περιεχόμενο επαρκές για <n> εξετάσεις	CONTROL - Αρνητικός ορός ελέγχου	Urine Fill Line Γραμμή πλήρωσης ούρων
CONTENT Περιεχόμενο του kit	 Μη αποστειρωμένο	Rx Only Μόνο για ΗΠΑ.: Η ομοσπονδιακή νομοθεσία των ΗΠΑ περιορίζει την πώληση αυτής της συσκευής μόνο από γιατρό ή κατόπιν εντολής γιατρού.
CONTROL Ορός ελέγχου	 Ονομα Ασθενή	 Ημερομηνία χρήσης έως
 Ημερομηνία κατασκευής	 Αριθμός ασθενούς	
 Ιατροτεχνολογικό προϊόν για εξέταση στον χώρο παροχής φροντίδας	 Ανοίξτε εδώ	
 Αυτοδιαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν	CONTROL + Θετικός ορός ελέγχου	
	QS copies / PCR Αντίγραφα του QS ανά αντίδραση PCR. Χρησιμοποιήστε τα αντίγραφα του QS ανά αντίδραση PCR κατά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.	

Τεχνική υποστήριξη

Για τεχνική υποστήριξη (βοήθεια) επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Κατασκευαστής

Πίνακας 46 Κατασκευαστής

Κατασκευάζεται στις ΗΠΑ



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

Κατασκευάζεται στις ΗΠΑ

Εμπορικά σήματα και διπλώματα ευρεσιτεχνίας

Επισκεφθείτε τη διεύθυνση <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.

Βιβλιογραφία

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.

Αναθεώρηση εγγράφου

Πληροφορίες αναθεώρησης εγγράφου	
Doc Rev. 8.0 07/2023	Στην ενότητα Όργανα και λογισμικό που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται, στην Ενότητα Α και στην Ενότητα Β, ενημερώθηκε η έκδοση λογισμικού συστήματος σε 2.2 και προστέθηκε μια αναφορά σημείωσης στην Κάρτα πληροφοριών προϊόντος. Ενημέρωση επωνυμίας cobas®. Ενημερώθηκε η ενότητα Εμπορικά σήματα και διπλώματα ευρεσιτεχνίας, συμπεριλαμβανομένου του συνδέσμου. Σε περίπτωση αποριών, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Roche.