



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° **7817**

BUENOS AIRES, **17 JUL. 2017**

VISTO el expediente N° 1-47-3110-50/17-7 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado **EGFR Mutation Test v2** / ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ADN obtenido de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina o de plasma de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. También como ayuda para elección de tratamiento. La prueba para uso con plasma también permite la medición semicuantitativa de las mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR a partir de recogidas en serie de plasma humano como ayuda en la gestión de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.

Que a fojas 118 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Σ  
U 1



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

DISPOSICIÓN N° **7817**

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 el por el Decreto N° 101 de fecha 16 de diciembre de 2015.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del producto de diagnóstico para uso in Vitro denominado **EGFR Mutation Test v2** / ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ADN obtenido de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina o de plasma de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. También como ayuda para elección de tratamiento. La prueba para uso con plasma también permite la medición semicuantitativa de las mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR a partir de recogidas en serie de plasma humano como ayuda en la gestión de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas , en envases conteniendo cantidad suficiente para 24 determinaciones con una vida útil de Vida útil DIECIOCHO (18) meses; Condiciones de almacenamiento 2°C a 8°C; el que será elaborado por ROCHE

Handwritten signature and initials.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N.M.A.T.

# DISPOSICIÓN N° 7817

MOLECULAR SYSTEMS, Inc. 1080 US Highway 202 South Branchburg, NJ 08876, Estados Unidos de America; *para:* ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim, Alemania e importado terminado por la firma PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) y que la composición se detalla a fojas 124.

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 13 a 24; y fojas 25 a 123. Desglosándose fojas 21 a 24; y fojas 25 a 57 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

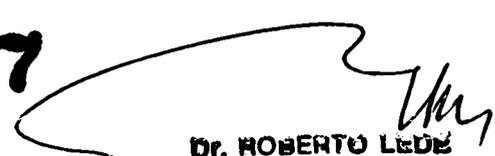
ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MEDICA se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

EXPEDIENTE N° 1-47-3110-50/17-7

DISPOSICIÓN N°:

**7817**

  
**Dr. ROBERTO LEDESMA**  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.

7817



PROYECTO DE ROTULO

Rótulo externo: ver imagen del estuche a continuación.

17 JUL. 2017

Sobre-rótulo local

Directora Técnica: Vanesa Diambra - Farmacéutica

Autorizado por la A.N.M.A.T. CERT XXXX

Establecimiento importador:

Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica).

Av. Belgrano 2126 - Don Torcuato, Pcia. de Buenos Aires

República Argentina

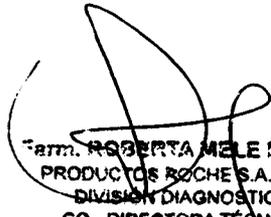
Uso profesional exclusivo.

Rótulos internos: ver a continuación imágenes del kit en la que pueden observarse los rótulos internos de cada componente y el detalle ampliado de cada rótulo interno.



E

F

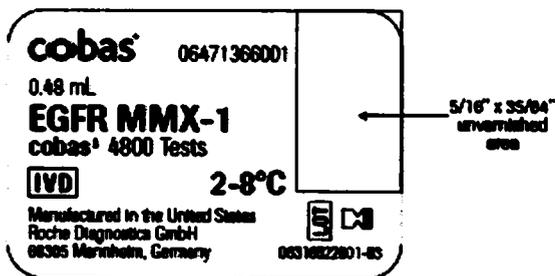
  
Farm. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CO - DIRECTORA TÉCNICA



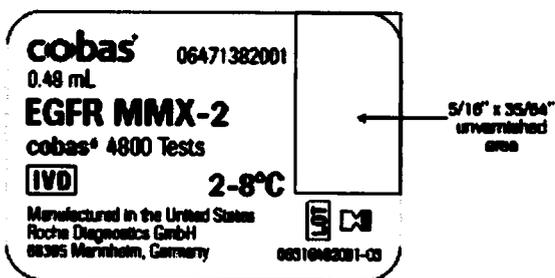
781722

Rótulos internos

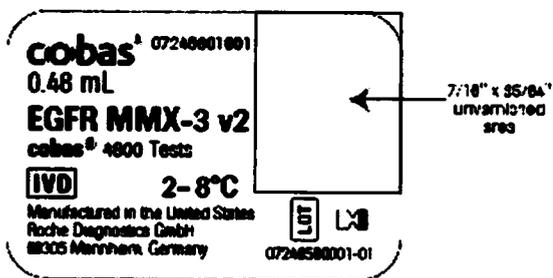
Reactivo EGFR MMX-1, 2 x 0.48 mL - P/N: 06471366001



Reactivo EGFR MMX-2, 2 x 0.48 mL - P/N: 06471382001



Reactivo EGFR MMX-3 v2 2 x 0.48 mL - P/N: 07248610001



Σ

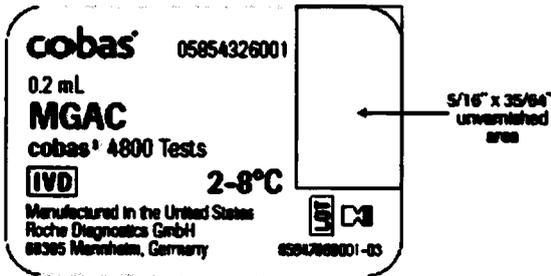
7

Farm. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUTTORI ROCHE S.A.O. S.R.L.  
DIVISIONE DIAGNOSTICA  
CO - DIRETORA TÉCNICA

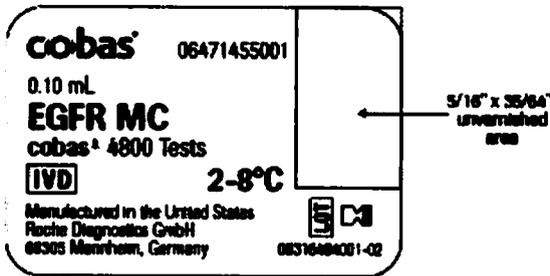
7817



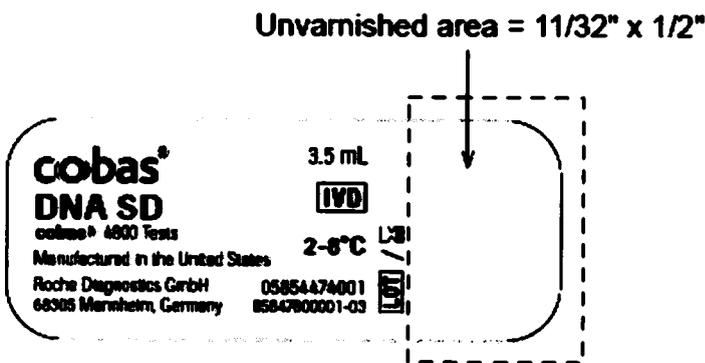
Reactivo MGAC, 6 x 0.2 mL - P/N: 05854326001



Reactivo EGFR MC, 6 x 0.1 mL - P/N: 06471455001



Reactivo DNA SD, 2 x 3.5 mL - P/N: 05854474001



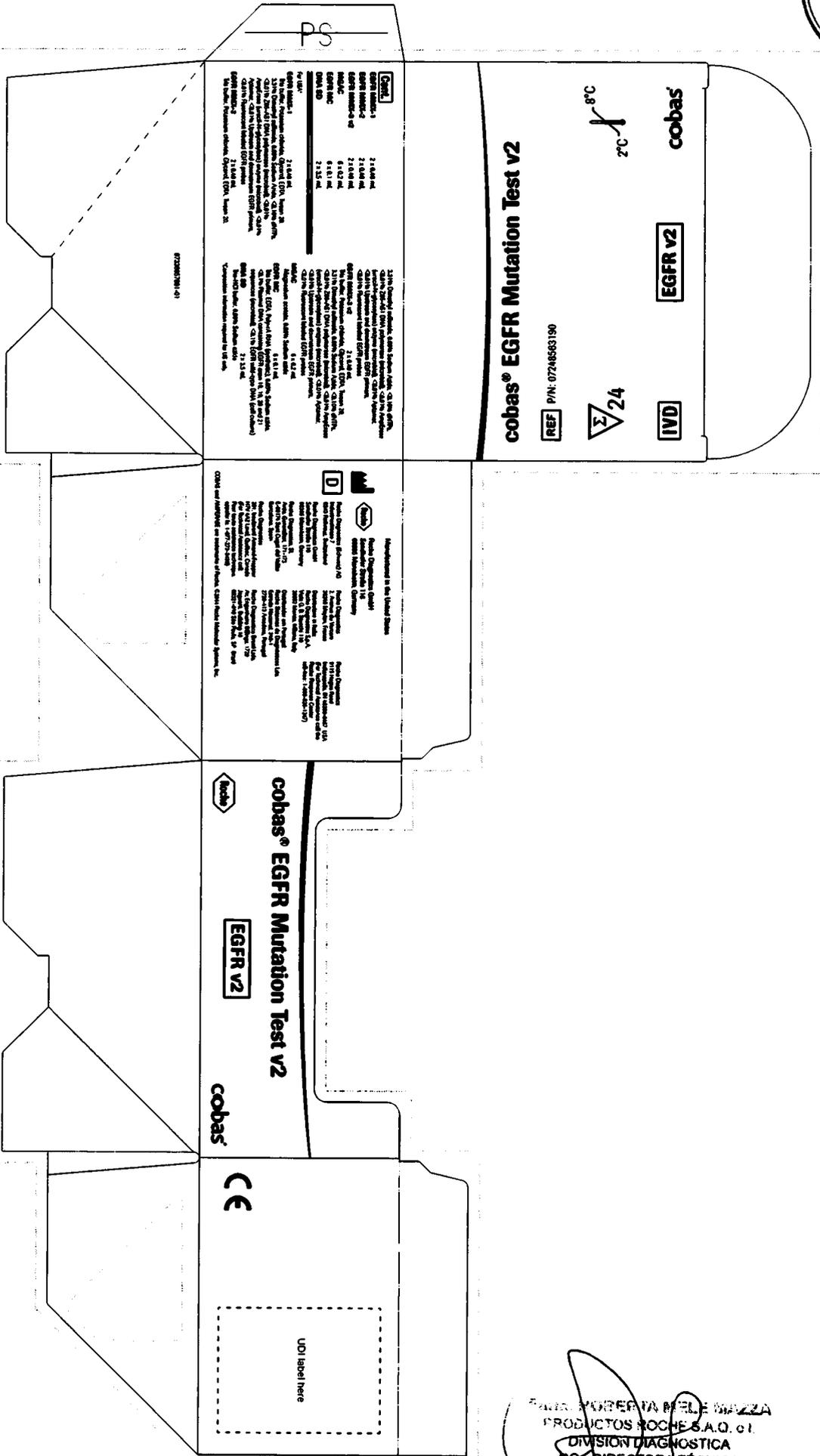
5

7

Firm. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.G. o I.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CO-DIRECTORA TÉCNICA



817



**cobas® EGFR Mutation Test v2**

REF PIN: 07248563190

32°C

EGFR v2

IVD

Σ 24

**Control**

EGFRv2 standard +	2.1.6.14.0 ml
EGFRv2 standard -	2.1.6.14.0 ml
EGFRv2 standard -	6.1.6.2.1 ml
EGFRv2 IVD	6.1.6.2.1 ml
EGFRv2 IVD	2.1.6.2.1 ml

**For IVD:**

2.1.6.14.0 ml: 2.1.6.14.0 ml EGFRv2 standard +, 2.1.6.14.0 ml EGFRv2 standard -, 2.1.6.14.0 ml EGFRv2 standard -.

**Manufactured in the United States**

**Roche Diagnostics GmbH**  
Bldg. 303, Kintzingerstr. 114  
68256 Mannheim, Germany

**Roche Diagnostics**  
4800 Kintzingerstr.  
Mannheim, Germany

**Roche Diagnostics**  
3401 Central Expressway  
Foster City, CA 94404  
USA

**Roche Diagnostics**  
Via Giuseppe Cesare  
10121 Turin, Italy

**cobas® EGFR Mutation Test v2**

EGFR v2

**cobas®**

CE

UDI label here

Design: 9129

3

7

FAVIA MORETTA MELI MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A. de C.V.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
de DIRECTORA TÉCNICA



**cobas®**  
**CE**

# **cobas® EGFR Mutation Test v2**

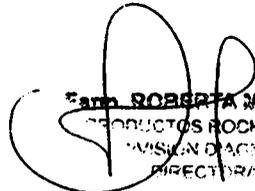
*Para diagnóstico in vitro*

**IVD**

<b>cobas® DNA Sample Preparation Kit</b>	24 Tests	P/N: 05985536190
<b>cobas® cfDNA Sample Preparation Kit</b>	24 Tests	P/N: 07247737190
<b>cobas® EGFR Mutation Test v2</b>	24 Tests	P/N: 07248563190

E

F

  
Roberta MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.O. di  
DIVISION DIAGNOSTICA  
DIRETTORE TECNICA

G

## TABLA DE CONTENIDO

### cobas® EGFR Mutation Test v2: Uso previsto

#### Resumen y explicación de la prueba

Información de referencia.....	5
Principios del procedimiento .....	7
Preparación de las muestras.....	7
Amplificación mediante PCR.....	7

#### APARTADO A: PARA USO CON MUESTRAS DE TEJIDO

##### Preparación de las muestras

##### Materiales y reactivos

Materiales y reactivos suministrados.....	10
Almacenamiento y manipulación de los reactivos .....	12
Material adicional necesario .....	13
Equipos y programas necesarios pero no suministrados.....	14

##### Precauciones y requisitos de manipulación

Advertencias y precauciones.....	14
Buenas prácticas de laboratorio.....	14
Contaminación .....	15
Integridad .....	15
Eliminación de residuos .....	15
Limpieza de derrames.....	16
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	16
Obtención de las muestras .....	16
Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras .....	16
Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas .....	16

##### Procedimiento analítico

Realización de la prueba.....	17
Instrucciones de uso .....	18
Procedimiento de aislamiento de ADN .....	20
Cuantificación del ADN.....	21
Amplificación y detección.....	22
Configuración del equipo.....	22
Configuración de las peticiones de pruebas .....	22
Configuración del equipo.....	23
Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra .....	24
Dilución de muestras .....	24

Configuración de las reacciones.....	25
Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2).....	25
Preparación de la placa.....	26
Inicio de la PCR.....	26
<b>Resultados</b>	
Interpretación de los resultados.....	27
Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos.....	28
Control de calidad y validez de los resultados.....	28
Control de mutación.....	28
Control negativo.....	28
Limitaciones del procedimiento.....	28
<b>Evaluación no clínica del rendimiento</b>	
Sensibilidad analítica - Límite de blanco.....	30
Límite de detección con mezclas de muestras de FFPET.....	30
Contenido tumoral mínimo.....	32
Especificidad - Microorganismos y homólogos de EGFR.....	33
Microorganismos pulmonares.....	33
Plásmidos de homólogos de EGFR.....	33
Interferencia.....	33
Tejido necrótico.....	33
Repetibilidad.....	34
Reproducibilidad de la manipulación de las muestras.....	34
<b>Evaluación clínica del rendimiento</b>	
Estudio de reproducibilidad clínica.....	35
Correlación con el método de referencia con muestras de la fase III del estudio EURTAC.....	36
Datos de los resultados clínicos.....	37
<b>APARTADO B: PARA USO CON MUESTRAS DE PLASMA</b>	
<b>Preparación de las muestras</b>	
<b>Materiales y reactivos</b>	
Materiales y reactivos suministrados.....	40
Almacenamiento y manipulación de los reactivos.....	43
Material adicional necesario.....	43
Equipos y programas necesarios pero no suministrados.....	44
<b>Precauciones y requisitos de manipulación</b>	
Advertencias y precauciones.....	44
Buenas prácticas de laboratorio.....	44
Contaminación.....	45

Integridad .....	45
Eliminación de residuos .....	45
Limpieza de derrames.....	46
Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras.....	46
Recogida y manipulación de muestras .....	46
Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras .....	46
Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas .....	46
<b>Procedimiento analítico</b>	
Realización de la prueba.....	47
Instrucciones de uso .....	47
Amplificación y detección.....	50
Configuración del equipo.....	51
Configuración de las reacciones.....	51
Preparación de la placa.....	52
Inicio de la PCR.....	53
<b>Resultados</b>	
Interpretación de los resultados .....	54
Índice semicuantitativo (SQI) .....	54
Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos.....	55
Control de calidad y validez de los resultados.....	55
Control de mutación.....	55
Control negativo.....	55
Limitaciones del procedimiento.....	55
<b>Evaluación no clínica del rendimiento</b>	
Límite de detección mediante ADN de línea celular.....	57
Correlación con MiSeq a partir de muestras clínicas de plasma conservadas en K2 EDTA .....	58
Linealidad .....	58
Repetibilidad .....	61
<b>Información adicional</b>	
Símbolos .....	62
Fabricante y distribuidores .....	63
Marcas registradas y patentes .....	63
Copyright.....	63
Bibliografía .....	64
Revisión del documento.....	65



## cobas® EGFR Mutation Test v2: Uso previsto

La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 es un ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ADN obtenido de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina (FFPET) o de plasma de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). La prueba también se ha diseñado como ayuda para seleccionar pacientes con CPCNP que puedan ser tratados con un inhibidor de la actividad de la tirosina cinasa (TKI) del gen EGFR.

La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 para uso con plasma también permite la medición semicuantitativa de las mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR a partir de recogidas en serie de plasma humano como ayuda en la gestión de pacientes con cáncer CPCNP.

Las muestras FFPET se procesan mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit, mientras que las muestras de plasma se procesan mediante el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit. La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 y el cobas z 480 analyzer se utilizan conjuntamente para la amplificación y detección automatizadas.

## Resumen y explicación de la prueba

### Información de referencia

Las mutaciones activadoras del gen codificador del EGFR se producen principalmente en presencia de CPCNP y su acción da lugar a la activación constitutiva de la actividad de la proteína cinasa del EGFR, lo que contribuye al proceso oncogénico.<sup>1</sup> La prevalencia de estas mutaciones en casos no seleccionados de CPCNP oscila entre el 10% y el 30% aproximadamente.<sup>2,3</sup> Sin embargo, estas mutaciones suelen producirse con mayor frecuencia, aunque no de manera exclusiva, en mujeres no fumadoras o fumadoras ocasionales de origen asiático y con histología de adenocarcinoma.<sup>4</sup>

Las mutaciones en EGFR más comunes en pacientes con CPCNP incluyen diferentes deleciones en el exón 19 y la mutación por sustitución L858R en el exón 21; estas mutaciones constituyen colectivamente aproximadamente el 85% de las mutaciones en EGFR observadas en pacientes con CPCNP.<sup>5</sup> La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 (prueba cobas® EGFR) es un ensayo de PCR a tiempo real diseñado para detectar las mutaciones por sustitución G719X en el exón 18, las mutaciones por deleción en el exón 19, las mutaciones por sustitución T790M y S768I en el exón 20, las mutaciones por inserción en el exón 20 y las mutaciones por sustitución L858R y L861Q en el exón 21.

En la tabla Tabla 1 se enumeran las mutaciones en EGFR detectadas por la prueba cobas® EGFR.

Tabla 1 La prueba cobas® EGFR se ha diseñado para detectar las mutaciones siguientes

Exón	Grupo de mutaciones en EGFR	Secuencia de ácidos nucleicos de EGFR	ID de COSMIC®
Exón 18	G719X	2156G>C	6239
		2155G>A	6252
		2155G>T	6253
Exón 19	Ex19Del	2240_2251del12	6210
		2239_2247del9	6218
		2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2237_2254del18	12367
		2240_2254del15	12369
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2235_2255>AAT	12385
		2237_2252>T	12386
		2239_2258>CA	12387
		2239_2256>CAA	12403
		2237_2253>TTGCT	12416
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2237_2251del15	12678
		2236_2253del18	12728
		2235_2248>AATTC	13550
		2235_2252>AAT	13551
		2235_2251>AATTC	13552
		2253_2276del24	13556
2237_2257>TCT	18427		
2238_2252del15	23571		
2233_2247del15	26038		
Exón 20	S768I	2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCGTGGACA	13428
2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558		
Exón 21	L858R	2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	12429
	L861Q	2582T>A	6213

## Principios del procedimiento

La prueba cobas® EGFR se basa en dos procesos principales: (1) preparación manual de las muestras para obtener ADN a partir de FFPET o plasma; y (2) amplificación y detección del ADN objetivo mediante PCR y pares de cebadores (primers) complementarios y sondas oligonucleótidas con marcadores fluorescentes. La prueba cobas® EGFR se ha diseñado para detectar las mutaciones siguientes:

- Exón 18: G719X (G719A, G719C y G719S)
- Exón 19: deleciones y mutaciones complejas
- Exón 20: S768I, T790M e inserciones
- Exón 21: L858R y L861Q

La detección de la mutación se realiza mediante el análisis de PCR con el cobas z 480 analyzer. Cada serie incluye un control de mutación y un control negativo para confirmar la validez de la serie.

## Preparación de las muestras

El cobas® DNA Sample Preparation Kit y el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit son preparaciones manuales de muestras basadas en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. La proteasa y un tampón de lisis/unión caotrópico liberan los ácidos nucleicos y protegen el ADN liberado de las DNasas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos celulares, se eliminan mediante centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN del fragmento objetivo en el cobas z 480 analyzer mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2.

## Amplificación mediante PCR

### Selección del fragmento objetivo

La prueba cobas® EGFR utiliza cebadores que definen secuencias específicas de pares de bases para cada una de las mutaciones objetivo de la prueba. Para la mutación por sustitución G719X en el exón 18 se analizan secuencias de entre 104 y 106 pares de bases; para las mutaciones por deleción en el exón 19 se analizan secuencias de entre 125 y 141 pares de bases; para la mutación por sustitución S768I en el exón 20 se analiza una secuencia de 133 pares de bases; para la mutación por sustitución T790M del exón 20 se analiza una secuencia de 118 pares de bases; para las mutaciones por inserción en el exón 20 se analizan secuencias de entre 125 y 143 pares de bases; para la mutación por sustitución L858R en el exón 21 se analiza una secuencia de 138 pares de bases y para la mutación por sustitución L861Q en el exón 21 se analiza una secuencia de 129 pares de bases. La amplificación tiene lugar únicamente en las regiones del gen EGFR comprendidas entre los cebadores. No se amplifica el gen EGFR entero.

### Amplificación del fragmento objetivo

Para la amplificación del fragmento objetivo se utiliza un derivado de la ADN polimerasa Z05-AS1 de la especie *Thermus*. En primer lugar, se calienta la mezcla de la PCR para desnaturalizar el ADN genómico y exponer las secuencias del fragmento objetivo del cebador. A medida que se enfría la mezcla, los cebadores que van en un sentido y en sentido contrario se hibridan con las secuencias del ADN objetivo. La ADN polimerasa Z05, en presencia de cationes metal divalente y exceso de dNTP, prolonga los cebadores hibridados, lo que provoca la síntesis con una segunda cadena de ADN. Con esto se completa el primer ciclo de la PCR, que da lugar a una copia de ADN bicatenario que incluye las regiones de pares de bases del fragmento objetivo del gen EGFR. Este proceso se repite un número determinado de ciclos, en cada uno de los cuales se duplica el volumen de ADN del amplicón.

**Detección de la mutación en tiempo real automatizada**

La prueba cobas® EGFR utiliza la tecnología de la PCR a tiempo real. Cada sonda oligonucleótida específica para un fragmento objetivo de la reacción se marca con un marcador fluorescente que actúa como emisor (reporter) y una molécula silenciadora (quencher) que absorbe las emisiones de fluorescencia del marcador emisor de una sonda intacta. Durante cada ciclo de amplificación, la sonda complementaria se une a la secuencia de ADN monocatenaria del amplicón y, posteriormente, se escinde por la actividad de la nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05-AS1. Una vez que el marcador emisor se separa del silenciador por la actividad de la nucleasa, es posible medir la fluorescencia con una longitud de onda característica cuando el marcador emisor se excita con el espectro lumínico adecuado. Se utilizan cuatro marcadores emisores distintos para etiquetar las mutaciones que pretende detectar la prueba. La amplificación de las siete secuencias objetivo del EGFR se detecta de manera independiente mediante tres reacciones que miden la fluorescencia en las cuatro longitudes de onda características de los canales ópticos dedicados.

**Amplificación selectiva**

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos del fragmento objetivo de la muestra se lleva a cabo mediante la prueba cobas® EGFR gracias a la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y al trifosfato de deoxiuridina (dUTP).<sup>7</sup> La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de cadenas de ADN que contienen deoxiuridina, pero no de cadenas que contienen timidina. El ADN natural carece de deoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de dUTP en lugar de trifosfato de desoxitimidina como uno de los trifosfatos del nucleótido en los reactivos de la Master Mix, por lo que sólo el amplicón contiene deoxiuridina. La deoxiuridina hace que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de realizar la amplificación del ADN del fragmento objetivo. La enzima AmpErase, que se incluye en los reactivos de la Master Mix, cataliza la escisión del ADN que contiene deoxiuridina en la posición de los residuos de deoxiuridina abriendo la cadena de la desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta durante el primer paso del ciclo térmico hasta un nivel pH alcalino, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase es inactiva a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos del ciclo térmico y, por consiguiente, no es capaz de destruir el amplicón del fragmento objetivo. La prueba cobas® EGFR es capaz de inactivar la deoxiuridina que contiene amplicón mutado del EGFR.



7817



APARTADO A: Para uso con muestras de tejido

cobas® EGFR Mutation Test v2

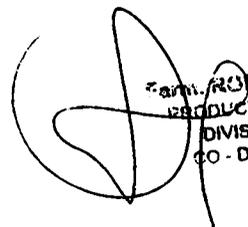
**SIGA LAS INSTRUCCIONES DEL APARTADO A PARA EL USO CON MUESTRAS DE TEJIDO.  
SIGA LAS INSTRUCCIONES DEL APARTADO B PARA EL USO CON MUESTRAS DE PLASMA.**

## APARTADO A: PARA USO CON MUESTRAS DE TEJIDO

### Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras FFPET y el aislamiento del ADN se lleva a cabo mediante el cobas® DNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras basada en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. A continuación, se realiza la lisis de una sección de 5 µm desparafinada de una muestra de FFPET mediante su incubación a una temperatura elevada con una proteasa y un tampón de lisis/unión caotrópico que liberan ácidos nucleicos y protegen el ADN genómico que liberan las DNAsas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de lisis y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el ADN genómico se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos celulares, se eliminan mediante centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. El volumen de ADN genómico se determina espectrofotométricamente y se ajusta según una concentración establecida para añadirse a la mezcla de amplificación/detección. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN del fragmento objetivo en el cobas z 480 analyzer mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2.

E

  
Dra. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. o l.  
DIVISIÓN DIAGNOSTICA  
CO - DIRECTORA TÉCNICA

Z

## Materiales y reactivos

### Materiales y reactivos suministrados

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia*
<b>cobas® DNA Sample Preparation Kit</b> (Kit de preparación de muestras de ADN para cobas®) 24 pruebas (P/N: 05985536190)	<b>DNA TLB</b> (DNA Tissue Lysis Buffer) (P/N: 05517613001) Tampón TRIS-HCl Cloruro potásico 0,04% de EDTA 0,1% de Tritón X-100 0,09% de azida sódica	1 x 10 ml	 <p>Peligro                      H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión e inhalación.                      H315: Provoca irritación cutánea.                      H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.                      H318: Provoca lesiones oculares graves.                      H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.                      H335: Puede irritar las vías respiratorias.                      P261: Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.                      P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.                      P284 Llevar equipo de protección respiratoria.                      P305 + P351 + P338 + P310: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.                      P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.                      P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.</p>
	<b>PK</b> (Proteinasa K) (P/N: 05860695102) Proteinasa K, liofilizada	1 x 100 mg	
	<b>DNA PBB</b> (DNA Paraffin Binding Buffer) (P/N: 05517621001) Tampón TRIS-HCl 49,6% de hidrocloreuro de guanidina 0,05% de urea 17,3% de Tritón X-100	1 x 10 ml	
	<b>WB I</b> (DNA Wash Buffer I) (P/N: 05517656001) Tampón TRIS-HCl 64% de hidrocloreuro de guanidina	1 x 25 ml	
	<b>WB II</b> (DNA Wash Buffer II) (P/N: 05517664001) Tampón TRIS-HCl Cloruro sódico	1 x 12,5 ml	
	<b>DNA EB</b> (DNA Elution Buffer) (P/N: 05517630001) Tampón TRIS-HCl 0,09% de azida sódica	1 x 6 ml	
	<b>FT</b> (Tubos de filtrado con tapones) (P/N: 05089506102)	1 x 25 ud.	
<b>CT</b> (Tubos de obtención de muestras) (P/N: 05880513001)	3 x 25 ud.		

781730



APARTADO A: Para uso con muestras de tejido

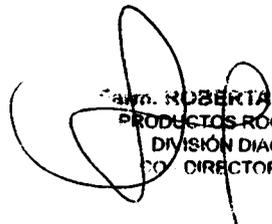
cobas® EGFR Mutation Test v2

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia*
cobas® EGFR Mutation Test v2 (Prueba de mutación en EGFR de cobas® v2) 24 pruebas (P/N: 07248563190)	<b>EGFR MMX-1</b> (EGFR Master Mix 1) (P/N: 06471366001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A
	<b>EGFR MMX-2</b> (EGFR Master Mix 2) (P/N: 06471382001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A
	<b>EGFR MMX-3 v2</b> (EGFR Master Mix 3) (P/N: 07248610001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

11

  
 Dra. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. S.  
 DIVISIÓN DIAGNÓSTICA  
 CO. DIRECTORA TÉCNICA

Kit/Casetes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia*
cobas® EGFR Mutation Test v2 (Prueba de mutación en EGFR de cobas® v2) 24 pruebas (P/N: 07248563190)	<b>MGAC</b> (Acetato de magnesio) (P/N: 05854326001) Acetato de magnesio 0,09% de azida sódica	6 x 0,2 ml	N/A
	<b>EGFR MC</b> (EGFR Mutant Control) (P/N: 06471455001) Tampón Tris EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,1% de ADN plasmídico que contiene secuencias del exón 18, 19, 20 y 21 del EGFR (microbianas) < 0,1% de ADN EGFR no mutado (cultivo celular)	6 x 0,1 ml	N/A
	<b>DNA SD</b> (DNA Specimen Diluent) (P/N: 05854474001) Tampón TRIS-HCl 0,09% de azida sódica	2 x 3,5 ml	N/A

\* Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

### Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Reactivo	Temperatura de almacenamiento	Periodo de almacenamiento
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Entre 15 °C y 30 °C	Una vez abierto, se mantiene estable para 8 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.
cobas® EGFR Mutation Test v2**	Entre 2 °C y 8 °C	Una vez abierto, se mantiene estable para 4 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.

Nota: a excepción del reactivo PK, no congele los reactivos.

\* Tras añadir agua estéril libre de nucleasas al reactivo PK, almacene el reactivo PK reconstituido no usado en alícuotas de 450 µl a una temperatura de -20 °C. Una vez reconstituido, el reactivo PK debe utilizarse en el plazo de 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero. Después de añadir etanol absoluto, almacene los tampones WB I y WB II a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. Estas soluciones de trabajo permanecen estables durante 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que se produzca primero.

\*\* Los reactivos EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y la solución MMX de trabajo (preparada añadiendo MGAC a EGFR MMX-1 o EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2) deben protegerse de la exposición a la luz. La mezcla MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la mezcla MMX de trabajo.



7817  
cobas® EGFR Mutation Test v2

APARTADO A: Para uso con muestras de tejido

## Material adicional necesario

Material	P/N
Xileno (ACS, > 98,5% de xilenos)	Cualquier proveedor
Etanol absoluto (prueba 200, para biología molecular)	Sigma E7023 o Fisher Scientific BP2818-500, o equivalente
Isopropanol (ACS, > 99,5%)	Sigma 190764 o Fisher Scientific A451-1, o equivalente
Agua estéril libre de nucleasas (para biología molecular)	Applied Biosystems (Ambion) AM9937 o GE Healthcare Hyclone™ SH3053801, o equivalente
Lejía	Cualquier proveedor
Etanol al 70%	Cualquier proveedor
Pipetas serológicas estériles y desechables de 5 ml y 25 ml	Cualquier proveedor
Microplaca (placa de amplificación y detección) y película de sellado para el cobas® 4800 System	Roche 05232724001
Aplicador de película de sellado para el cobas® 4800 System (suministrado con la instalación del cobas® 4800 System)	Roche 04900383001
Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl)	Cualquier proveedor
Puntas exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo	Cualquier proveedor
Pipet-Aid™	Drummond 4-000-100, o equivalente
Microcentrífuga de mesa de trabajo* (centrifugado a 20.000 x g)	Eppendorf 5430 o 5430R, o equivalente
Dos bloques de calor seco para calentar tubos para microcentrífuga a una temperatura de 56 °C y 90 °C*	Cualquier proveedor
Tubos para microcentrífuga Safe-Lock™ (capacidad de 1,5 ml, estériles, exentos de RNasa/DNasa y grado PCR)	Eppendorf 022363204 o equivalente
Bandejas de tubos para microcentrífuga	Cualquier proveedor
Espectrofotómetro para medir la concentración de ADN*	Cualquier proveedor
Agitador vórtex*	Cualquier proveedor
Guantes desechables sin talco	Cualquier proveedor
Termómetros calibrados para el bloque de calor seco*	Cualquier proveedor
Baño de agua* capaz de mantener la temperatura a 37 °C	Cualquier proveedor
Cuchilla de un solo filo o similar	Cualquier proveedor

\* Debe realizarse el mantenimiento del equipo de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

13

ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. o.l.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CO. DIRECTORA TÉCNICA

## Equipos y programas necesarios pero no suministrados

Equipos y programas necesarios, no suministrados
cobas z 480 analyzer
Unidad de control del cobas® 4800 System con software del sistema versión 2.1 o posterior
Software del paquete de análisis de tejidos EGFR versión 1.0 o posterior
Lector de códigos de barras ext. por USB
Impresora (p. ej., HP P2055d)

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

## Precauciones y requisitos de manipulación

### Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

- Para diagnóstico in vitro exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- Esta prueba debe utilizarse con muestras de FFPE de CPCNP. Las muestras deben tratarse como material infeccioso, por lo que deben aplicarse procedimientos de seguridad de laboratorio como los descritos en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>8</sup> y en el documento M29-A4 del CLSI.<sup>9</sup>
- Los reactivos DNA PBB y DNA TLB contienen Tritón X-100, un irritante de las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y las membranas mucosas.
- El xileno es una sustancia química peligrosa y debe utilizarse en una campana de gases. Deséchelo en un contenedor de residuos químicos según la reglamentación local, estatal y federal.
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipeteador exentas de DNasa.

### Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70%.

**Nota:** la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25%. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

## Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para la prueba cobas® EGFR, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección. Para evitar la contaminación de la solución Master Mix de trabajo con muestras de ADN, el área de trabajo de amplificación y detección debería limpiarse exhaustivamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo.

## Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

## Eliminación de residuos

- Los reactivos DNA TLB, DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC y DNA SD contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

## Limpieza de derrames

- Los reactivos DNA PBB y WB I contienen hidrocloreuro de guanidina. Si se vierte líquido que contenga este tampón, límpielo con detergente apto para laboratorio y agua. Si se vierte líquido que contenga agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada primero con detergente para laboratorio y agua y luego con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Si el derrame se produce sobre el cobas® 480 instrument, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en el Manual del sistema correspondiente del cobas® 4800 System.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el cobas z 480 analyzer. Limpie el cobas z 480 analyzer según las instrucciones detalladas en el Manual del sistema correspondiente del cobas® 4800 System.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del cobas z 480 analyzer, consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer.

## Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

*Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.*

### Obtención de las muestras

Las muestras de FFPET de CPCNP se han validado para su uso con la prueba cobas® EGFR.

### Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

Las muestras de FFPET de CPCNP se pueden transportar a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C. El transporte de las muestras de FFPET debe cumplir las reglamentaciones nacionales, federales, estatales y locales para el transporte de agentes etiológicos.<sup>10</sup>

Se ha confirmado la estabilidad de las muestras de FFPET almacenadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante un máximo de 12 meses tras la fecha de la recogida. Las secciones de 5 µm colocadas en portaobjetos pueden almacenarse a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C hasta 60 días.

### Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

Las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables como se indica a continuación:

Temperatura de almacenamiento del ADN extraído	Entre -15 °C y -25 °C	Entre 2 °C y 8 °C	Entre 15 °C y 30 °C
Período de almacenamiento	Hasta 3 ciclos de congelación/descongelación durante 60 días	Hasta 14 días	Hasta 1 día

El ADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

7817



APARTADO A: Para uso con muestras de tejido

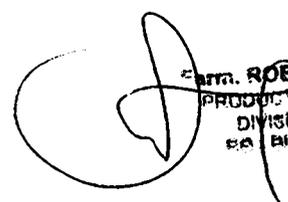
cobas® EGFR Mutation Test v2

## Procedimiento analítico

### Realización de la prueba

Ilustración 1 Flujo de trabajo de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 con el cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Inicie el sistema.
2	Efectúe el mantenimiento del equipo.
3	Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento.
4	Desparafinice las muestras.
5	Lleve a cabo el aislamiento del ADN.
6	Eluya el ADN.
7	Cree la petición de trabajo e imprima la distribución de la placa.
8	Prepare los reactivos de amplificación.
9	Cargue la microplaca con los reactivos de amplificación.
10	Cargue la microplaca con muestras.
11	Selle la microplaca.
12	Cargue la microplaca en el cobas z 480 analyzer.
13	Inicie la serie analítica.
14	Revise los resultados.
15	Con LIS: envíe los resultados al LIS.
16	Descargue el analizador.

  
 Sra. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A. o l.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 SA. BIOMETRIA TECNICA

**Instrucciones de uso**

*Nota: la prueba cobas® EGFR solamente admite secciones de FFPET de CPCNP con un grosor de 5 µm y que contengan como mínimo un 10% de células tumorales. Las muestras con menos de un 10% de células tumorales por área deben someterse a macrodissección después de la desparafinación.*

*Nota: consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer para obtener instrucciones de uso detalladas del cobas z 480 analyzer.*

*Nota: los bloques de calor seco que permiten calentar los tubos para microcentrífugas Safe-Lock™ deben encenderse y ponerse a una temperatura comprendida entre 56 °C y 90 °C.*

**Tamaño de la serie**

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada microplaca de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba cobas® EGFR.

La prueba cobas® EGFR contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

**Preparación de los reactivos**

Prepare los reactivos de trabajo como se muestra a continuación antes de utilizar el kit por primera vez. Utilice una pipeta serológica de 5 ml para dispensar el agua. Utilice pipetas serológicas de 25 ml para dispensar el etanol. Si la proteinasa K se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar.

Reactivos	Reconstitución/Preparación
Proteinasa K (PK)	Reconstituya la proteinasa K (PK) añadiendo 4,5 ml de agua estéril libre de nucleasas (grado PCR) al vial mediante una pipeta serológica estéril y desechable de 5 ml. Mezcle el contenido invirtiendo el vial de 5 a 10 veces. Transfiera una parte alícuota de 450 µl de PK reconstituida a tubos para microcentrífuga de 1,5 ml Safe-Lock™ y almacénelos a -20 °C durante un máximo de 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Si la proteinasa K se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar antes de la desparafinación (se necesitan 70 µl de PK reconstituida para cada muestra).
Tampón de lavado I (WB I)	Prepare el tampón WB I de trabajo añadiendo 15 ml de etanol absoluto a la botella de WB I. Mezcle bien invirtiendo la botella entre 5 y 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB I a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.
Tampón de lavado II (WB II)	Prepare el tampón WB II de trabajo añadiendo 50 ml de etanol absoluto a la botella de WB II. Mezcle el contenido invirtiendo la botella de 5 a 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB II a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.

Todas las soluciones almacenadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C deben ser claras. Si detecta algún precipitado en los reactivos, caliente la solución en agua a 37 °C hasta que se disuelva el precipitado. No utilice el reactivo hasta se haya disuelto el precipitado por completo.

781

**APARTADO A: Para uso con muestras de tejido**

cobas® EGFR Mutation Test V2

**Desparafinación de las secciones de FFPET colocadas en portaobjetos**

**Nota:** *el xileno es una sustancia química peligrosa. Todos los pasos del proceso de desparafinación deben realizarse en una campana de gases. Consulte el apartado "Advertencias y precauciones".*

**Nota:** *si la muestra contiene menos de un 10% de células tumorales por área, será necesario proceder a su macrodissección.*

1. Añada un portaobjetos con una sección de FFPET de 5 µm a un contenedor con xileno suficiente para cubrir el tejido y déjelo en remojo durante 5 minutos.
2. Transfiera el portaobjetos a un contenedor con etanol absoluto suficiente para cubrir el tejido y déjelo en remojo durante 5 minutos.
3. Retire el portaobjetos del etanol y deje secar la sección completamente (de 5 a 10 minutos).
4. Realice una macrodissección si la muestra contiene menos de un 10% de células tumorales por área.
5. Etiquete un tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ de 1,5 ml para cada muestra con la información de identificación de la muestra.
6. Añada 180 µl de reactivo DNA TLB al tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ de 1,5 ml.
7. Añada 70 µl de PK reconstituida al tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ que contiene DNA TLB.
8. Retire el tejido del portaobjetos e introdúzcalo en el tubo para microcentrífuga Safe-Lock™. Sumerja el tejido en la mezcla de DNA TLB/PK.
9. A continuación, proceda con el paso 1 del apartado Procedimiento de aislamiento de ADN.

**Desparafinación de las secciones de FFPET no colocadas en portaobjetos**

**Nota:** *el xileno es una sustancia química peligrosa. Todos los pasos del proceso de desparafinación deben realizarse en una campana de gases. Consulte el apartado "Advertencias y precauciones".*

**Nota:** *si la muestra contiene menos de un 10% de células tumorales por área, debe colocarse la sección en un portaobjetos para proceder a su macrodissección y llevar a cabo el procedimiento que se detalla en "Desparafinación de las secciones de FFPET colocadas en portaobjetos".*

1. Coloque una sección de FFPET de 5 µm en un tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ de 1,5 ml etiquetado con la información de identificación de la muestra para cada muestra.
2. Añada 500 µl de xileno a un tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ que contenga la sección de FFPET.
3. Mezcle bien el contenido mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.
4. Deje reposar el contenido del tubo durante 5 minutos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C.
5. Añada 500 µl de etanol absoluto y mezcle el contenido mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.
6. Deje reposar el contenido del tubo durante 5 minutos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C.
7. Centrifugue a una velocidad de entre 16.000 x g y 20.000 x g durante 2 minutos. Extraiga el sobrenadante sin disgregar el sedimento. Deseche el sobrenadante en un contenedor de residuos químicos.
8. Añada 1 ml de etanol absoluto y mezcle el contenido con un agitador vórtex durante 10 segundos.
9. Centrifugue a una velocidad de entre 16.000 x g y 20.000 x g durante 2 minutos. Extraiga el sobrenadante sin disgregar el sedimento. Deseche el sobrenadante en un contenedor de residuos químicos.
10. Si el sedimento flota en el sobrenadante que queda, vuelva a centrifugar a 16.000-20.000 x g durante 1 minuto. Elimine todo resto de sobrenadante.
11. Seque el sedimento de tejido durante 10 minutos a 56 °C en un bloque de calentamiento con el tubo abierto.

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

19



DR. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUTOS ROCHE S.A. Q. O. I.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CC - DIRECTORA TÉCNICA

12. Asegúrese de que el etanol se haya evaporado totalmente y de que el sedimento esté seco antes de proceder con el paso siguiente.
13. En caso necesario, los sedimentos secos pueden almacenarse hasta 24 horas a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
14. Vuelva a suspender el sedimento de tejido en 180 µl de tampón de lisis del tejido de ADN (DNA TLB).
15. Añada 70 µl de PK reconstituida.
16. A continuación, proceda con el paso 1 del apartado **Procedimiento de aislamiento de ADN**.

### Procedimiento de aislamiento de ADN

**Nota:** *procese un control negativo simultáneamente a las muestras. Prepare el control negativo mediante la combinación de 180 µl de DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB) y 70 µl de solución de PK en un tubo para microcentrifuga Safe-Lock™ de 1,5 ml etiquetado como NEG. El control negativo se debe procesar siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras.*

1. Mezcle el contenido de los tubos que contienen la muestra o la mezcla de DNA TLB/PK y la mezcla de control negativo (NEG) mediante un agitador vórtex durante 30 segundos.

**Nota:** *el tejido debe sumergirse totalmente en la mezcla de DNA TLB/PK.*

2. Coloque los tubos en el bloque de calor seco a 56 °C e incúbelo durante 60 minutos.
3. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante 10 segundos.

**Nota:** *el tejido debe sumergirse totalmente en la mezcla de DNA TLB/PK.*

4. Coloque los tubos en el bloque de calor seco a 90 °C e incúbelo durante 60 minutos.

**Nota:** *durante la incubación, prepare el número requerido de tubos de filtrado (FT) con tapones de bisagras colocando el FT en un tubo de obtención de muestras (CT) y etiquetando cada tapón de FT con la identificación adecuada de la muestra o el control.*

**Nota:** *cada muestra necesita 1 tubo FT, 3 tubos CT y 1 tubo de elución (tubo para microcentrifuga Safe-Lock™ de 1,5 ml).*

**Nota:** *durante la incubación, etiquete el número requerido de tubos de elución (tubos para microcentrifuga de 1,5 ml) con la identificación adecuada de la muestra o el control.*

5. Deje que los tubos se enfríen hasta alcanzar los 15 °C-30 °C. Una vez enfriados, realice una centrifugación rápida de los tubos para recoger el exceso de líquido de los tapones.
6. Añada 200 µl de DNA PBB a cada tubo y mezcle el contenido moviendo la pipeta verticalmente 3 veces.
7. Incube los tubos a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C durante 10 minutos.
8. Añada 100 µl de isopropanol a cada tubo y mezcle el lisado moviendo la pipeta verticalmente 3 veces.
9. Transfiera cada lisado al tubo FT/CT debidamente etiquetado.
10. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.
11. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo del tubo CT anterior en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.
12. Añada 500 µl de reactivo WB I de trabajo a cada tubo FT.

**Nota:** *en el apartado "Preparación de los reactivos" se describe cómo preparar el reactivo WB I de trabajo.*

13. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.
14. Deseche el flujo de cada tubo CT en el contenedor de residuos químicos. Vuelva a colocar el tubo FT en el mismo tubo CT.
15. Añada 500 µl de reactivo WB II de trabajo a cada tubo FT.

**Nota:** *en el apartado "Preparación de los reactivos" se describe cómo preparar el reactivo WB II de trabajo.*



7817

**APARTADO A: Para uso con muestras de tejido**

cobas® EGFR Mutation Test v2

16. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.
17. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo del tubo CT anterior en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.
18. Centrifugue los tubos FT/CT a 16.000-20.000 x g durante 1 minuto para secar las membranas de los filtros.
19. Coloque cada tubo FT en un tubo de elución (tubo para microcentrífuga de 1,5 ml) previamente etiquetado con la identificación de la muestra o el control. Deseche el flujo del tubo CT usado en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT usado como corresponde.
20. Añada 100 µl de reactivo DNA EB en el centro de cada membrana del tubo FT, pero sin tocarla.
21. Incube el tubo FT con el tubo de elución a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C durante 5 minutos.
22. Centrifugue el tubo FT con el tubo de elución a 8.000 x g durante 1 minuto para obtener la solución de elución en el tubo de elución. Elimine adecuadamente el tubo FT usado.
23. Cierre el tapón del tubo de elución. El tubo de elución contiene el stock de ADN. A continuación, proceda con el paso 1 del apartado Cuantificación del ADN.

**Nota:** *la medición de la concentración de ADN debe realizarse inmediatamente después del procedimiento de aislamiento de ADN y antes del almacenamiento.*

**Cuantificación del ADN**

1. Mezcle cada stock de ADN mediante un agitador vórtex durante 5 segundos.
2. Cuantifique el ADN mediante un espectrofotómetro, según el protocolo del fabricante. Utilice el reactivo DNA EB como blanco para el equipo. Es necesario un promedio de dos lecturas coincidentes. Si las lecturas de concentración de ADN son > 20,0 ng/µl, las dos mediciones no deben presentar una diferencia mayor a ± 10% entre ellas. En el caso de las lecturas de concentración de ADN < 20,0 ng/µl, la diferencia entre ambas mediciones no debe superar los ± 2 ng/µl. Si las dos mediciones presentan una diferencia mayor a ± 10% entre ellas cuando las lecturas de concentración de ADN son > 20,0 ng/µl o mayor a ± 2 ng/µl cuando las lecturas de concentración de ADN son < 20,0 ng/µl, se deben realizar 2 lecturas adicionales hasta que se cumplan los requisitos. A continuación, debe calcularse el promedio de estas dos nuevas mediciones.

**Nota:** *no es necesario medir el stock de ADN del control negativo (NEG CT) procesado.*

3. La concentración de stock de ADN de las muestras debe ser > 2 ng/µl para realizar la prueba cobas® EGFR. Se realizan tres ciclos de amplificación/detección por muestra, para cada uno de los cuales se utilizan 25 µl de una dilución de 2 ng/µl de stock de ADN (un total de 50 ng de ADN).

**Nota:** *cada stock de ADN debe tener una concentración mínima de 2 ng/µl para realizar la prueba de mutación en EGFR de cobas®. Si la concentración de un stock de ADN es < 2 ng/µl, repita los procedimientos de desparafinación, aislamiento de ADN y cuantificación de ADN para esa muestra utilizando dos secciones de FFPET de 5 µm. En los casos de las muestras colocadas en portaobjetos, tras la desparafinación, combine el tejido de ambas secciones en un tubo, sumerja el tejido en DNA TLB + PK y lleve a cabo el aislamiento de ADN y la cuantificación, tal y como se ha descrito anteriormente. En los casos de las muestras que no están colocadas en portaobjetos, combine las dos secciones en un tubo, sumerja el tejido en DNA TLB + PK y lleve a cabo el aislamiento de ADN y la cuantificación, tal y como se ha descrito anteriormente. Si la concentración del stock de ADN sigue siendo < 2 ng/µl, solicite otra sección de muestra de FFPET al centro clínico correspondiente.*

**Nota:** *las muestras procesadas (ADN extraído) se mantienen estables hasta 24 horas a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C, hasta 14 días a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C o hasta 60 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C, o después de someterse a 3 ciclos de congelación/descongelación si se almacenan a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C. El ADN extraído debe amplificarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit utilizado para extraer el ADN, lo que se produzca primero.*

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

21

*7*

*[Signature]*  
Fanny ROBERTA MELE MARZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.C. S.I.  
DIVISIÓN DIAGNOSTICA  
CO - DIRECTORA TÉCNICA

**Amplificación y detección**

**Nota:** para evitar la contaminación de las mezclas MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y luego con una solución de etanol al 70%. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25%. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

**Configuración del equipo**

Consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer para obtener instrucciones detalladas sobre cómo configurar el analizador.

**Configuración de las peticiones de pruebas**

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR, consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer del cobas® 4800 System y el Manual de usuario de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. El control de mutación se carga en las posiciones A01-A03 de la placa. El control negativo se carga en las posiciones B01-B03 de la placa. A continuación, se añaden las muestras diluidas en juegos de 3 columnas, comenzando por C01-C03 hasta H09-H12, tal como se indica en la Ilustración 2.

**Ilustración 2 Distribución de la placa para la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2**

Fila / Columna	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

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra, y MMX n.º corresponde al reactivo de Master Mix 1, 2, 6 3 v2.

**Nota:** cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

781


**APARTADO A: Para uso con muestras de tejido**

cobas® EGFR Mutation Test v2

**Nota:** la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo v2 se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

**Nota:** se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.

**Configuración del equipo**

4. Encienda el cobas z 480 analyzer. El equipo puede tardar varios minutos en calentarse antes de poder empezar la serie.
5. Encienda la unidad de control. La unidad de control inicia sesión en Windows automáticamente.
6. Haga doble clic en el icono del cobas® 4800 software e inicie sesión para llevar a cabo la serie mediante el ID de usuario y la contraseña específicos del laboratorio.
7. Haga clic en el icono "New Run" del menú.
8. Se abrirá la ventana emergente "Select Test". Seleccione la prueba de tejidos EGFR y haga clic en el botón "OK".
9. Cuando aparezca la pantalla "Work Place", escriba el código de barras de la MWP en el campo para la identificación de la microplaca, o bien escanéelo. Escanee los códigos de barras para la identificación del kit de aislamiento de ADN y el kit de reactivos de la prueba de mutación en EGFR de cobas® para introducirlos en los campos correspondientes. En el campo "Sample", introduzca "24" para el primer kit y "6" para el segundo (si desea ejecutar una placa completa de 30 muestras). Si desea analizar menos de 24 muestras, introduzca el número correspondiente en el campo de muestras de la primera fila.
10. El campo "Sample ID" se rellena automáticamente para las posiciones de control. Escriba el ID de muestra exclusivo de cada una de las muestras en la columna de identificación de la muestra, o bien escanéelo.
11. Una vez introducidos los ID de muestra, seleccione el botón "Save" ubicado en la esquina inferior izquierda de la pantalla.
12. Guarde el archivo con el nombre predeterminado asignado por el software.
13. Cree una distribución de placa con la posición de todas las muestras y controles de la serie. Para ello, haga clic en el botón "Print" y seleccione "File" -> "Print" en la ventana de vista previa. Rellene siempre la placa por columnas, comenzando por las posiciones de EGFR MC de la A01 a la A03 y EGFR NEG en las posiciones de la B01 a la B03. Distribuya las muestras comenzando por las posiciones de la C01 a la C03 y continúe hacia abajo hasta las posiciones de la H01 a la H03; a continuación, proceda con las posiciones de la A04 a la A06 y continúe hacia abajo hasta las posiciones de la H04 a la H06 hasta distribuir todas las muestras (ilustración 2).

Patrizia COSENTI MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A.O. o l.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 CO - DIRECTORA TÉCNICA

## Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra

### Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN entre 2 ng/μl y 36 ng/μl

*Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.*

*Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).*

1. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (μl) de stock de ADN necesario:  
$$\mu\text{l de stock de ADN} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{concentración de stock de ADN [ng}/\mu\text{l}]$$
2. Para cada muestra, se debe calcular el volumen (μl) de diluyente para muestras de ADN (DNA SD) necesario:  
$$\mu\text{l de DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l de stock de ADN}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 6,5 ng/μl

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

### Cálculo de la dilución para concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl

*Nota: es necesario diluir los stocks de ADN de las muestras justo antes de la amplificación y detección.*

*Nota: se realizan tres ciclos de amplificación/detección de cada muestra que requieren un volumen total de 75 μl (25 μl para cada una de las tres reacciones) de una dilución de 2 ng/μl de stock de ADN (un total de 150 ng de ADN).*

1. Con concentraciones de stock de ADN > 36 ng/μl, utilice la fórmula siguiente para calcular la cantidad de diluyente para muestras de ADN (DNA SD) necesario a fin de preparar al menos 90 μl de stock de ADN diluido. De esta manera se garantiza que cada muestra utilice como mínimo 5 μl de stock de ADN.
2. Para cada muestra, calcule el volumen de (μl) de DNA SD necesario para diluir 5 μl de stock de ADN en 2 ng/μl:  
$$\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l de stock de ADN} \times \text{concentración de stock de ADN en ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Ejemplo:

Concentración de stock de ADN = 100 ng/μl

1.  $\text{Vol. de DNA SD necesario en } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Utilice el volumen calculado de DNA SD para diluir 5 μl de stock de ADN.

## Dilución de muestras

1. Prepare el número adecuado de tubos para microcentrífuga Safe-Lock™ de 1,5 ml para diluciones de ADN etiquetándolos con la identificación de muestra correspondiente.
2. Con un pipeteador equipado con una punta resistente a aerosoles, pipetee los volúmenes calculados de DNA SD en los tubos etiquetados correspondientes. Pipetee 45 μl de DNA SD en un tubo para microcentrífuga Safe-Lock™ etiquetado como NEG.
3. Mezcle cada stock de ADN y el control negativo mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
4. Con un pipeteador con punta de pipeta resistente a aerosoles (una punta nueva para cada pipeteado), pipetee con cuidado el volumen calculado de cada stock de ADN en el tubo etiquetado correspondiente que contiene DNA SD. Pipetee 45 μl de control negativo (elución extraída) en el tubo NEG.
5. Tape los tubos y agítelos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 5 a 10 segundos.
6. Cámbiese los guantes.

## Configuración de las reacciones

### Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)

**Nota:** las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MMX de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición a la luz.

**Nota:** debido a la viscosidad de las mezclas EGFR y la mezcla MMX de trabajo, realice el pipeteado lentamente para asegurarse de que dispensa completamente la muestra por la punta.

**Nota:** las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 y EGFR MMX-3 v2 pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.

Prepare tres mezclas MMX de trabajo a granel, una con EGFR MMX-1, otra con EGFR MMX-2 y la tercera con EGFR MMX-3 v2 en tubos para microcentrifuga Safe-Lock™ de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Calcule el volumen de MGAC necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 2 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

**Tabla 2** Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo

		N.º muestras*									
		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
Vol. total para cada MMX de trabajo (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

\* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MGAC necesario de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrifuga estéril para la mezcla MMX-1 de trabajo, MMX-2 de trabajo y MMX-3 v2 de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 al tubo de MMX de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de MGAC a los tubos de MMX de trabajo.
6. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

**Nota:** las muestras y los controles deben añadirse a la microplaca (placa de amplificación y detección) durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas de trabajo MMX.

**Nota:** utilice únicamente microplacas (placas de amplificación y detección) y películas de sellado para el cobas® 4800 System.

F. ROBERTA MELE MAZZA
   
 PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. o.l.
   
 DIVISION DIAGNOSTICA
   
 COO. DIRECTORA TÉCNICA

### Preparación de la placa

1. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la microplaca (placa de amplificación y detección) necesario para la serie. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
  - Añada MMX-1 de trabajo (que contiene EGFR MMX-1) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
  - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene EGFR MMX-2) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
  - Añada MMX-3 v2 de trabajo (que contiene EGFR MMX-3 v2) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.
2. Pipetee 25 µl de EGFR MC en los pocillos A01, A02 y A03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de NEG en los pocillos B01, B02 y B03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

**Nota:** cada serie debe contener un control positivo (EGFR MC) en los pocillos A01, A02 y A03, y un control negativo (NEG) en los pocillos B01, B02 y B03. En caso contrario, el cobas z 480 analyzer invalidará la serie.

**Nota:** cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra diluida, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos C01, C02 y C03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN diluido de las segundas muestras (pocillos D01, D02 y D03). Siga la plantilla de la ilustración 2 hasta que todas las diluciones de ADN de la muestra estén cargadas en la microplaca (placa de amplificación y detección). Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.
5. Tape la microplaca (placa de amplificación y detección) con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la microplaca (placa de amplificación y detección).
6. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

**Nota:** los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla MMX de trabajo.

### Inicio de la PCR

Consulte el Manual de usuario de cobas® EGFR para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR.

## Resultados

### Interpretación de los resultados

**Nota:** la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el cobas® 4800 software.

**Nota:** una prueba válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3 Interpretación de los resultados de la prueba cobas® EGFR**

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Interpretación
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Puede existir más de una mutación)	Se ha detectado una mutación en la región del EGFR objetivo de la prueba especificada.
No Mutation Detected (NMD)*	N/A	No se ha detectado ninguna mutación en las regiones del EGFR analizadas.
Invalid	N/A	El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado "Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos" que figura más adelante.
Failed	N/A	Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica.

\* Un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en las regiones del EGFR analizadas porque los resultados dependen del porcentaje de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

## Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos

1. Repita la dilución del stock de ADN de la muestra no válida empezando por los procedimientos “Cálculo de la dilución para el stock de ADN de la muestra” y “Dilución de las muestras” del apartado **Amplificación y detección**.
2. Después de realizar la dilución del stock de ADN a 2 ng/μl según las instrucciones del apartado “Dilución de las muestras” continúe con los pasos descritos en el apartado “Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)” y con los demás pasos del procedimiento de amplificación y detección.

**Nota:** *si la muestra sigue siendo no válida después de volver a analizarla o si no había stock de ADN suficiente para preparar otra dilución según el paso A del apartado “Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos”, repita todo el procedimiento de análisis con la misma muestra, empezando por el proceso de desparafinación y aislamiento de ADN con una nueva sección tumoral de FFPE de 5 μm.*

## Control de calidad y validez de los resultados

Para cada serie con un máximo de 30 muestras se incluye un juego de control de mutación en EGFR de cobas® (EGFR MC) (pocillos A01, A02 y A03) y un control negativo (NEG) (pocillos B01, B02 y B03) para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo. Una serie se considera válida cuando el control de mutación EGFR (EGFR MC) y los pocillos del control negativo (NEG) también son válidos. Si un control de mutación en EGFR (EGFR MC) o un control negativo (NEG) no es válido, toda la serie se considera no válida y debe repetirse. Prepare una dilución nueva del stock de ADN de la muestra aislada previamente para configurar una nueva microplaca (placa de amplificación y detección) con controles para la amplificación y detección.

### Control de mutación

El resultado del control de mutación en EGFR (EGFR MC) debe ser “Valid”. Si los resultados de EGFR MC no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

### Control negativo

El resultado del control negativo (NEG) debe ser “Valid”. Si los resultados de NEG no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

## Limitaciones del procedimiento

1. Analice sólo los tipos de muestras indicados. La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 sólo se ha validado para su uso con muestras tumorales de FFPE de CPCNP.
2. La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 sólo se ha validado con el cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, el volumen de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que la fijación, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento de las muestras sean adecuados. Siga los procedimientos de la metodología del reactivo y del Manual de usuario de la prueba cobas® EGFR.
5. Tampoco se han evaluado los efectos de otras variables potenciales como la fijación de muestras.



7817

**APARTADO A: Para uso con muestras de tejido**

**cobas<sup>®</sup> EGFR Mutation Test v2**

6. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba cobas<sup>®</sup> EGFR permite realizar una amplificación selectiva del ADN objetivo; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en esta metodología del reactivo para evitar la contaminación de los reactivos.
7. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del cobas<sup>®</sup> 4800 System.
8. Solamente cobas z 480 analyzer se ha validado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
9. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.
10. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen EGFR cubiertas por los cebadores o las sondas de la prueba cobas<sup>®</sup> EGFR pueden causar errores en la detección de la presencia de una mutación en los exones 18, 19, 20 y 21 (resultados "No Mutation Detected").
11. La prueba cobas<sup>®</sup> EGFR presenta reactividad cruzada (resultados "Mutation Detected") con la mutación L747S del exón 19, una mutación adquirida poco frecuente que puede presentar resistencia al tratamiento con TKI.<sup>11</sup>
12. La prueba cobas<sup>®</sup> EGFR se ha validado para el uso con 50 ng de ADN por pocillo de reacción. No se recomienda introducir cantidades de ADN inferiores a 50 ng por pocillo de reacción.
13. La prueba cobas<sup>®</sup> EGFR es una prueba cualitativa. La prueba no debe utilizarse para realizar mediciones cuantitativas del porcentaje de mutación.
14. Las muestras de FFPET de CPCNP que contienen ADN degradado pueden afectar la capacidad de la prueba para detectar mutaciones en el gen EGFR.
15. Es posible que las muestras con resultados "No Mutation Detected" contengan mutaciones en EGFR que el ensayo no detecta.
16. La prueba cobas<sup>®</sup> EGFR detecta mutaciones en EGFR en pacientes con CPCNP metastásicos cuyos tumores presentan sustituciones en el exón 18 (G719X), deleciones en el exón 19, inserciones y sustituciones en el exón 20 (T790M, S768I) y sustituciones en el exón 21 (L858R, L861Q), pero ningún otro tipo de mutaciones en EGFR.

E

DR. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A. Q. G. I.  
DIVISIÓN DIAGNOSTICA  
CO - DIRECTORA TÉCNICA

## Evaluación no clínica del rendimiento

**Nota:** *las descripciones del estudio que se muestran a continuación incluyen datos acumulados obtenidos con la v1 y la v2 de la prueba cobas® EGFR.*

En los estudios no clínicos que se describen a continuación, el porcentaje tumoral se evaluó mediante revisión patológica. Se utilizaron la secuenciación bidireccional Sanger y la secuenciación de próxima generación (NGS) para seleccionar las muestras de análisis. El porcentaje de mutación de las muestras de FFPET de CPCNP se determinó a partir de un método NGS.

### Sensibilidad analítica – Límite de blanco

Para evaluar el rendimiento de la prueba cobas® EGFR en ausencia de una plantilla y asegurarse de que una muestra en blanco no generase una señal analítica que pudiera indicar una concentración de mutación baja, se evaluaron muestras sin plantilla y muestras de EGFR no mutado de FFPET de CPCNP. De acuerdo con el análisis descrito en la directriz EP17-A2 del CLSI<sup>12</sup>, se determinó que el límite de blanco fuese cero para todas las clases de mutación.

### Límite de detección con mezclas de muestras de FFPET

Se mezclaron tres extractos de ADN de muestras de FFPET para las mutaciones por delección en el exón 19, cuatro extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación L858R, dos extractos de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para las mutaciones L858R y T790M, dos extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación G719A, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para T790M y G719A, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para las mutaciones G719C y S768I, un extracto de ADN de muestras de FFPET de mutación dual para S768I y G719S, tres extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación por inserción en el exón 20 y tres extractos de ADN de muestras de FFPET para la mutación L861Q con extractos de muestras de FFPET de EGFR no mutado para conseguir muestras con un nivel de mutación deseada del 10, 5,0, 2,5 y 1,25%, tal y como determina el método de secuenciación de próxima generación (NGS), validado para el uso en la detección de mutaciones en EGFR en los exones 18, 19, 20 y 21. Se prepararon diluciones en serie de cada mezcla de muestras y se analizaron ocho réplicas de cada miembro del panel utilizando cada uno de los tres lotes del kit de la prueba cobas® EGFR (n=24/miembro del panel). El límite de detección de cada muestra se determinó a partir del volumen más bajo de ADN que generó un resultado "Mutation Detected" para EGFR de como mínimo un 95% para la mutación analizada, tal y como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4 Límite de detección de la prueba cobas® EGFR con mezclas de muestras de FFPET**

Exón del EGFR	Grupo de mutaciones en EGFR	Secuencia de ácidos nucleicos de EGFR	Porcentaje de mutación del miembro del panel necesario para obtener una tasa de resultados "Mutation Detected" ≥ 95% con un volumen inicial de ADN de 50 ng por pocillo de reacción (N=24 réplicas)	ID de COSMIC*
18	G719X	2155 G>T	5,6	6253
		2155 G>A	3,2	6252
		2156 G>C	4,7	6239
		2156 G>C	2,5	6239
19	Delección en el exón 19	2235_2249del15	1,4	6223
		2236_2250del15	2,5	6225
		2238_2252del15	2,4 <sup>#</sup>	23571
		2239_2248>C	2,2	12382
		2240_2254del15	7,2	12369
		2240_2257del18	13,4 <sup>**</sup>	12370
		2237_2253>TTGCT*	6,32	12416
		2237_2255>T*	4,08	12384
		2239_2256del18*	4,74	6255
		2238_2252del15*	5,45 <sup>#</sup>	23571
		2239_2257>GT*	6,02	No identificado
20	T790M	2369 C>T	2,4	6240
		2369 C>T	3,0	6240
		2369 C>T	2,0	6240
	S768I	2303 G>T	2,4	6241
		2303 G>T	1,3	6241
	Inserción en el exón 20	2307_2308insGCCAGCGTG	6,8	12376
		2310_2311insGGT	1,3	12378
2319_2320insCAC		2,1	12377	
21	L858R <sup>+</sup>	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

\* Para las mutaciones no dominantes de delección del exón 19 presentes en el estudio de cohorte EURTAC solamente se analizó un nivel objetivo de aproximadamente un 5% de mutación. Las mezclas de ADN de muestras se analizaron en 3 laboratorios.

\*\* El límite de detección de la prueba cobas® EGFR para esta mutación supera el nivel de mutación del 10% si se utiliza el volumen estándar de 50 ng por pocillo de reacción.

#Se analizaron dos muestras independientes para la delección del exón 19 (2238\_2252del15).

+Se analizaron cinco muestras L858R independientes.

Este estudio demuestra que la prueba cobas® EGFR es capaz de detectar mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR con un nivel de mutación mínimo del 5% cuando se utiliza un volumen inicial estándar de 50 ng por pocillo de reacción.

### Contenido tumoral mínimo

Se analizaron un total de 66 muestras distintas con mutación en EGFR (es decir, 35 con mutaciones de delección del exón 19 y 31 con mutaciones L858R del exón 21) cuyo contenido tumoral oscilaba entre el 25% y el 99% para determinar el contenido tumoral mínimo necesario para la detección de mutaciones en EGFR en muestras de CPCNP. Ninguna de las muestras evaluadas presentaba la combinación de mutaciones de delección del exón 19 y mutación L858R del exón 21. Todas las muestras se analizaron sin macrodissección (sin diluir) y con posterioridad a la macrodissección. Los valores de CtR observados para los portaobjetos sin diluir y macrodisseccionados se analizaron mediante regresión de Deming y el gráfico de Bland-Altman (diferencia vs. media). Los resultados refuerzan el uso de muestras con un contenido tumoral superior al 25% sin macrodissección.

Se analizaron 10 muestras adicionales de EGFR no mutado de CPCNP (contenido tumoral del 1-90%) y 10 muestras mutantes de EGFR (contenido tumoral del 8-95%) para determinar si la macrodissección de tejido tumoral de CPCNP con un porcentaje tumoral bajo mejoraba la capacidad de detección de la prueba cobas® EGFR. Todas las muestras se analizaron sin macrodissección y con posterioridad a la macrodissección. Todos los resultados de las muestras macrodisseccionadas coincidieron con los resultados de las muestras sin macrodisseccionar y las 20 muestras presentaron los resultados mutados y no mutados esperados.

En el estudio EURTAC fase III de tratamiento con erlotinib vs. quimioterapia basada en cisplatino, las muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10% se macrodisseccionaron antes de realizar el análisis de la mutación en EGFR. Se analizó un subconjunto de las muestras cribadas de EURTAC mediante la prueba cobas® EGFR y el método de secuenciación de próxima generación (NGS) para determinar el estado mutacional del gen EGFR. En las tablas Tabla 5 y Tabla 6 se incluyen las muestras de CPCNP con resultados válidos para la presencia simultánea de la mutación del exón 19 y L858R del gen EGFR asignados tanto de la prueba cobas® EGFR como de la secuenciación NGS. Cuando se utiliza la NGS como método de referencia, los resultados prueban que la macrodissección de secciones de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10% ofrece una precisión analítica comparable a la sección de FFPET de CPCNP sin macrodissección.

Ambos estudios avalan la necesidad de realizar una macrodissección de las secciones de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral inferior al 10% antes de realizar la prueba cobas® EGFR.

**Tabla 5 Rendimiento de la prueba cobas® EGFR para muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral ≤ 10% (macrodisseccionadas)**

Medida de concordancia	Concordancia de porcentaje (N)	IC del 95%
Concordancia de porcentaje de positivos (PPA)	97,2% (35/36)	85,8%-99,5%
Concordancia de porcentaje de negativos (NPA)	94,5% (52/55)	85,1%-98,1%
Concordancia de porcentaje general (OPA)	95,6% (87/91)	89,2%-98,3%

**Tabla 6 Rendimiento de la prueba cobas® EGFR para muestras de FFPET de CPCNP con un contenido tumoral > 10% (sin macrodisseccionar)**

Medida de concordancia	Concordancia de porcentaje (N)	IC del 95%
Concordancia de porcentaje de positivos (PPA)	93,0% (107/115)	86,9%, 96,4%
Concordancia de porcentaje de negativos (NPA)	98,5% (199/202)	95,7%, 99,5%
Concordancia de porcentaje general (OPA)	96,5% (306/317)	93,9%, 98,1%

## Especificidad – Microorganismos y homólogos de EGFR

La especificidad de la prueba cobas® EGFR se evaluó mediante el análisis de microorganismos pulmonares y plásmidos de homólogos de EGFR, es decir, plásmidos cuyas secuencias de las regiones genéticas HER2, HER3 y HER4 eran análogas a las secuencias de los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR amplificadas mediante la prueba cobas® EGFR.

### Microorganismos pulmonares

Se ha observado que las cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* con una concentración de  $4 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias no presentan reactividad cruzada ni interfieren en la detección de la prueba cobas® EGFR cuando se añaden a muestras que contienen secuencias de EGFR mutado y no mutado durante el proceso de lisis del tejido.

### Plásmidos de homólogos de EGFR

Se ha demostrado que las secuencias análogas relacionadas estructuralmente con el receptor proteína tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4) no presentan reactividad cruzada con la prueba cobas® EGFR cuando la secuencia que podría presentar reactividad cruzada se añade al stock de ADN aislado antes del procedimiento de amplificación/detección en un número de copias genómicas equivalente a un nivel de entrada de 50 ng/PCR. Se incluyó una condición de control sin ADN plasmídico. Los resultados indican que las mutaciones observadas para las 20 muestras de FFPET analizadas se correspondían con la mutación esperada determinada por la secuenciación, independientemente de si el ADN plasmídico para el gen HER añadido está presente o no. También se analizó la mutación L747S del exón 19 de EGFR para determinar la existencia de reactividad cruzada. Los resultados indican que la prueba cobas® EGFR presenta reactividad cruzada con la mutación L747S del exón 19 de EGFR.

### Interferencia

Se ha demostrado que los triglicéridos (37 mM, la concentración más elevada recomendada por el CLSI<sup>13</sup>) y la hemoglobina (2 mg/ml, la concentración más elevada recomendada por el CLSI<sup>13</sup>) no interfieren en la detección de la prueba cobas® EGFR cuando la sustancia interferente potencial se añade al proceso de lisis durante la preparación de la muestra.

Se ha demostrado que el albuterol (Ventolin), el ipratropium (Atrovent), la fluticasona (Flonase), la ceftazidima (Fortaz), el imipenem-cilastatina (Primaxin), la piperacilina-tazobactam (Primaxim), la cilastatina (cilastatina sódica), la betadina y la lidocaína no interfieren en el rendimiento de la prueba cobas® EGFR cuando se añaden al paso de lisis durante el procedimiento de preparación de la muestra.

### Tejido necrótico

Se ha demostrado que las muestras de FFPET de CPCNP con un contenido de tejido necrótico de hasta el 60% para las muestras de EGFR mutado y el 85% en las muestras no mutadas no interfieren en la identificación de resultados en la prueba cobas® EGFR.

## Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba cobas® EGFR se valoró a partir de seis muestras de FFPET, que incluían: dos muestras de EGFR no mutado y cuatro muestras de EGFR mutado, una de cada: mutaciones de delección del exón 19, S768I y G719X, T790M y L858R, y de inserción del exón 20. Las muestras se analizaron por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos cobas z 480 analyzers durante cuatro días. Se evaluaron un total de 32 réplicas por muestra. La prueba cobas® EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 96,9% (186/192).

La repetibilidad de la prueba cobas® EGFR también se evaluó en un segundo estudio en el que se utilizaron cuatro muestras de FFPET, que incluían: una muestra de EGFR no mutado y tres muestras de FFPET de EGFR mutado, una de cada: mutaciones L861Q, G719X y de inserción del exón 20. Las muestras se analizaron por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos cobas z 480 analyzers durante varios días. La prueba cobas® EGFR presenta una precisión de identificación correcta del 99,2% (127/128) para todas las réplicas de muestras, usuarios, lotes de reactivos y equipos combinados.

## Reproducibilidad de la manipulación de las muestras

Se estudió la reproducibilidad del cobas® DNA Sample Preparation Kit mediante secciones obtenidas de tres bloques de muestras de FFPET, uno de los cuales contenía una mutación de delección del exón 19, otro, una mutación L858R y otro, ninguna mutación. Se analizó cada muestra por duplicado todos los días en cada uno de los laboratorios. Se aleatorizaron secciones de muestras de una determinada muestra y se analizaron en los tres laboratorios durante un periodo de seis días mediante un usuario en cada centro, con un cobas z 480 analyzer en cada centro, tres lotes del cobas® DNA Sample Preparation Kit y un lote del kit de la prueba cobas® EGFR. Cada día, cada usuario aisló y analizó el ADN de dos secciones plegadas de FFPET de CPCNP para cada muestra mediante la prueba cobas® EGFR. Todas las muestras generaron resultados válidos y correctos durante los seis días de análisis. Teniendo en cuenta todas las muestras y los usuarios, la prueba cobas® EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 100% (108/108).

# Evaluación clínica del rendimiento

## Estudio de reproducibilidad clínica

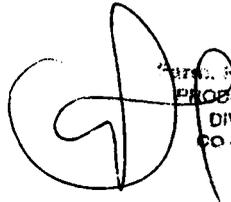
Se realizó un estudio externo para valorar la reproducibilidad de la prueba cobas® EGFR en 3 laboratorios de análisis externos (2 usuarios por laboratorio), con 3 lotes de reactivos y durante 5 días de análisis no consecutivos utilizando un panel de 13 miembros de muestras de ADN obtenidas de secciones de FFPET de muestras tumorales de CPCNP no mutado (WT) y mutado (MT). El panel incluía la mutación L858R del exón 21 y cinco mutaciones distintas de delección del exón 19. De las 92 series, 90 (97,8%) resultaron válidas. Se realizaron un total de 2.340 pruebas con los 13 miembros del panel en 90 series válidas. Todos los resultados obtenidos fueron válidos. No se obtuvieron resultados "No Mutation Detected" para ninguna de las 180 pruebas válidas de los miembros no mutados del panel, lo que supone una concordancia del 100%. La concordancia fue del 100% para 10 de los 12 miembros mutados del panel. Para el miembro del panel EX19\_2240\_2257del18 - 5% de mutación, la concordancia fue del 62,8% (67 de los 180 resultados de la prueba generaron un resultado "Mutation Not Detected"). Para el miembro del panel EX19\_2240\_2257del18 - 10% de mutación, la concordancia fue del 99,4% (1 de los 180 resultados de la prueba generó un resultado "Mutation Not Detected"). En la Tabla 7 se muestran los resultados de concordancia general. El coeficiente de variación (CV) fue < 6% para todos los miembros del panel de mutación. Para cada miembro del panel, el CV fue < 3,5%. Para el control externo, el CV general fue < 1,3%. El porcentaje del CV entre lotes fue < 0,5% y < 1,2% intralote.

**Tabla 7 Estimaciones de concordancia general por miembro del panel en el estudio de reproducibilidad de la prueba cobas® EGFR**

Miembro del panel	Número de pruebas válidas	Concordancia (N)	% de concordancia (IC del 95%)*
No mutado	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 - 5% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 - ≤10% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 - 5% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 - ≤10% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C - 5% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C - ≤10% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 - 5% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 - ≤10% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 - 5% de mutación	180	113	62,8 (55,3, 69,9)*
EX19_2240_2257del18 - ≤10% de mutación	180	179	99,4 (96,9, 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R - 5% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R - ≤10% de mutación	180	180	100 (98,0, 100,0)

Nota: se considera que existe concordancia de resultados cuando un miembro mutado del panel genera un resultado válido "Mutation Detected" o cuando un miembro no mutado del panel genera un resultado válido "Mutation Not Detected".  
 \* IC del 95% = Intervalo de confianza binomial exacto del 95%.  
 \* La sensibilidad analítica de la prueba cobas® EGFR para la detección de esta mutación supera el nivel de mutación del 10% si se utiliza el volumen estándar de 50 ng por pocillo de reacción.





DR. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A.O. S.L.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 CO-DIRECTORA TÉCNICA

## Correlación con el método de referencia con muestras de la fase III del estudio EURTAC

El rendimiento clínico de la prueba cobas® EGFR se valoró mediante comparación con dos métodos de referencia (secuenciación bidireccional doble Sanger y secuenciación cuantitativa de próxima generación [NGS]) con 487 muestras de tumor pulmonar impregnadas en parafina y fijadas en formalina de pacientes con CPCNP avanzado a los que se sometió a cribado en el estudio EURTAC de fase III de tratamiento con erlotinib vs. quimioterapia basada en cisplatino.<sup>14,15</sup> Las características clínicas y demográficas de los pacientes cuyas muestras se pudieron utilizar para el análisis retrospectivo son comparables a las de otros pacientes elegibles de otro modo (557) cuyas muestras no estaban disponibles para la repetición de la prueba.

Para el estudio EURTAC se cribó un total de 1.276 pacientes mediante una combinación de pruebas desarrolladas para laboratorio, conocidas colectivamente como ensayo inmunohistoquímico de investigación (CTA). Una vez excluidos los pacientes no elegibles y aquellos sin resultados de CTA, el número de pacientes potencialmente elegibles para el estudio actual fue de 1.044. De estos 1.044 pacientes elegibles, 225 muestras resultaron positivas para la mutación con el ensayo CTA, 792 resultaron no mutadas con CTA y 27 generaron resultados inconclusivos con CTA. De los 1.044 pacientes que podrían ser elegibles, se pudo disponer de 487 muestras para la repetición de la prueba cobas® EGFR.

Se llevó a cabo un análisis ciego de las 487 muestras mediante la prueba cobas® EGFR y la secuenciación Sanger. De estas, se obtuvieron 406 resultados válidos con la prueba cobas® EGFR y la secuenciación Sanger, 38 resultados no válidos con la prueba cobas® EGFR y la secuenciación Sanger, 38 resultados no válidos exclusivamente con la secuenciación Sanger y 5 resultados no válidos exclusivamente con la prueba cobas® EGFR. De las 487 muestras disponibles para la repetición de la prueba cobas® EGFR, 444 generaron resultados válidos con la prueba cobas® EGFR y se analizaron también con el método NGS. De estas, se obtuvieron 36 resultados no válidos mediante NGS; por lo tanto, 408 generaron resultados válidos tanto con la prueba cobas® EGFR como con el método NGS. La precisión analítica de la prueba cobas® EGFR comparada con cada método de referencia se evaluó mediante la estimación de los porcentajes de concordancia de positivos (PPA), de concordancia de negativos (NPA) y de concordancia general (OPA), y sus correspondientes IC del 95%, para las deleciones del exón 19 y las mutaciones L858R agregadas.

En el estudio de cohorte EURTAC, la prueba cobas® EGFR detectó las siguientes mutaciones de deleciones del exón 19 del gen EGFR (Tabla 8):

**Tabla 8 Mutaciones detectadas en el estudio de cohorte EURTAC con la prueba cobas® EGFR**

Exón	Mutación	Cambio AA	ID de COSMIC®
19	2234_2251>AAT	K745_T751>K	No identificado
	2236_2244del9	E746_R748>E	No identificado
	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	No identificado
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	No identificado
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383

En el análisis de concordancia se incluyeron un total de 406 muestras con resultados válidos para la prueba cobas® EGFR y el método Sanger. El porcentaje PPA entre la prueba cobas® EGFR y la secuenciación Sanger fue del 96,6% (IC del 95%: del 91,5% al 98,7%) y la NPA fue del 88,3% (IC del 95%: del 84,1% al 91,5%), para la detección agregada de deleciones del exón 19 y mutaciones L858R, tal como se muestra en la Tabla 9. El porcentaje OPA fue del 90,6%, con un límite inferior del IC del 95% superior al 87%.

7817



APARTADO A: Para uso con muestras de tejido

cobas® EGFR Mutation Test V2

**Tabla 9 Comparación entre la prueba cobas® EGFR y la secuenciación Sanger para la detección de mutaciones en EGFR de delección del exón 19 y la mutación L858R**

Medida de concordancia	Concordancia de porcentaje (N)	IC del 95%
Concordancia de porcentaje de positivos (PPA)	96,6% (112/116)	91,5%, 98,7%
Concordancia de porcentaje de negativos (NPA)	88,3% (256/290)	84,1%, 91,5%
Concordancia de porcentaje general (OPA)	90,6% (368/406)	87,4%, 93,1%

En el análisis de concordancia se incluyeron un total de 408 muestras con resultados válidos para la prueba cobas® EGFR y el método NGS. En comparación, los porcentajes PPA y NPA agregados entre la prueba cobas® EGFR y NGS para la detección de delecciones del exón 19 y la mutación puntual L858R fueron del 94,0% (IC del 95%: entre 89,1% y 96,8%) y del 97,7% (IC del 95%: entre 95,0% y 98,9%), respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 10. El porcentaje OPA fue del 96,3%, con un límite inferior de IC del 95% del 94,0%.

**Tabla 10 Comparación entre la prueba cobas® EGFR y el método NGS para la detección agregada de mutaciones en EGFR de delección del exón 19 y la mutación L858R**

Medida de concordancia	Concordancia de porcentaje (N)	IC del 95%
Concordancia de porcentaje de positivos (PPA)	94,0% (142/151)	89,1%, 96,8%
Concordancia de porcentaje de negativos (NPA)	97,7% (251/257)	95,0%, 98,9%
Concordancia de porcentaje general (OPA)	96,3% (393/408)	94,0%, 97,8%

## Datos de los resultados clínicos

### EURTAC

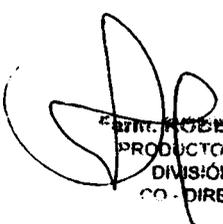
El estudio EURTAC fase III es un estudio abierto, multicéntrico y aleatorizado del tratamiento con Tarceva® (erlotinib) versus la quimioterapia doble con base en platino como primera línea de tratamiento para pacientes con CPCNP avanzado cuyos tumores alberguen delecciones del exón 19 del gen EGFR o mutaciones por sustitución del exón 21 (L858R) y que no han recibido quimioterapia, según un ensayo inmunohistoquímico (CTA). El estudio se llevó a cabo gracias al patrocinio del Grupo Español de cáncer de pulmón (GECP). En el estudio participaron un total de 174 pacientes. Los resultados del estudio muestran que los pacientes tratados con Tarceva® presentan un incremento estadísticamente importante de la tasa de supervivencia libre de progresión (SLP) (SLP media de 10,4 meses vs. 5,1 meses) en comparación con los pacientes tratados con quimioterapia, con un cociente de riesgos de 0,34 ( $p < 0,0001$ , IC del 95% [0,23; 0,49]). El índice de respuesta de los pacientes con tratamiento de Tarceva® fue superior al de los pacientes tratados con quimioterapia (65,1% vs. 16,1%). En cambio, no se observaron diferencias significativas en la tasa de supervivencia global (TSG) entre las dos líneas de tratamiento, ya que un 76% de los pacientes tratados con quimioterapia estándar pasaron a ser tratados con Tarceva®.

De los 174 pacientes que participaron en el estudio EURTAC, 134 casos (el 77% de la población del estudio, incluidos 69 pacientes de la línea de erlotinib y 65 pacientes de la línea de quimioterapia) estuvieron disponibles para repetir la prueba y se analizaron retrospectivamente con la prueba cobas® EGFR. De los 134 casos que se volvieron a analizar con la prueba cobas® EGFR, 116 (59 pacientes de la línea con erlotinib y 57 pacientes de la línea con quimioterapia) generaron un resultado "Mutation Detected" con la prueba cobas® EGFR. El análisis del subconjunto de estas 116 muestras revela que los pacientes tratados con Tarceva® presentaron un incremento significativo de la SLP (SLP media de 10,4 vs. 5,4 meses) y fueron menos propensos a padecer una enfermedad progresiva o morir (cociente de riesgos = 0,34, IC del 95% [0,21; 0,54],  $p < 0,0001$ ) que otros pacientes sometidos a quimioterapia (Ilustración 3). La tasa de respuesta en la línea de tratamiento con Tarceva® fue superior en comparación con la línea de quimioterapia (59,3% vs. 14,0%). No se

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

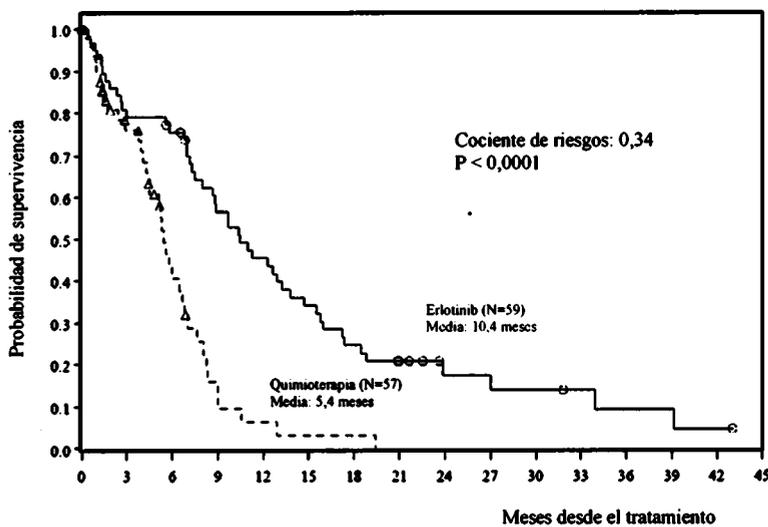
37

  
 DR. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A. o.l.  
 DIVISIÓN DIAGNOSTICA  
 CO-DIRECTORA TÉCNICA

observaron diferencias significativas de la TSG entre ambos grupos. El beneficio clínico observado en el subconjunto de pacientes analizados con la prueba cobas® EGFR fue comparable al observado en la población total del estudio (Tabla 11).

Se realizó un análisis de eficacia adicional para valorar los pacientes cuyo resultado fue positivo para la prueba cobas® EGFR y negativo o no válido para el ensayo CTA. En el peor de los escenarios (un cociente de riesgos de 1 para pacientes con resultados positivos para la prueba cobas® EGFR y negativos para el ensayo CTA), los datos indican un cociente de riesgos de 0,42 (IC del 95% [0,26; 0,57]).

**Ilustración 3** Representación gráfica del estimador Kaplan-Meier de la SLP por tratamiento de pacientes con resultados "Mutation Detected" con la prueba cobas® EGFR (valoración del investigador)



**Tabla 11** El beneficio clínico de pacientes analizados con la prueba cobas® EGFR es comparable con el observado en la población del estudio EURTAC

Parámetro	cobas®-población positiva n = 116		EURTAC n = 173*	
	Quimioterapia n = 57	Erlotinib n = 59	Quimioterapia n = 87	Erlotinib n = 86
SLP				
Media (meses)	5,4	10,4	5,1	10,4
Cociente de riesgos	0,34		0,34	
Cociente de riesgos IC del 95%	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
Valor p (prueba de rango logarítmico)	< 0,0001		< 0,0001	

\*Nota: un paciente retiró su consentimiento tras la finalización del estudio EURTAC, con lo que el conjunto de datos es n = 173

E.

7817



## APARTADO B: PARA USO CON MUESTRAS DE PLASMA

### Preparación de las muestras

El procesamiento de las muestras de plasma y el aislamiento del ADN libre circulante (cfADN) se lleva a cabo mediante el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit, una preparación manual de muestras genéricas basada en la unión de ácidos nucleicos a fibras de vidrio. Se procesan dos mililitros (ml) de plasma con una proteasa y un tampón de unión caotrópico que protege el cfDNA de las DNAsas. Posteriormente se añade isopropanol a la mezcla de unión y se centrifuga mediante una columna con un filtro de fibra de vidrio. Durante la fase de centrifugación, el cfADN se une a la superficie del filtro de fibra de vidrio. Las sustancias no fijadas, como sales, proteínas y otros desechos, se eliminan durante la centrifugación. Los ácidos nucleicos absorbidos se lavan y, a continuación, se eluyen con una solución acuosa. A continuación se lleva a cabo la amplificación y detección del ADN del fragmento objetivo en el cobas z 480 analyzer mediante los reactivos de amplificación y detección suministrados con el kit de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2.

E

7

ROBERTA MELE MAZZA  
ROCHE S.A.Q. s.r.l.  
DIVISIONE DIAGNOSTICA  
DIRETTORICA TECNICA

## Materiales y reactivos

### Materiales y reactivos suministrados

Kit/Casetes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia*
<b>cobas® cfDNA Sample Preparation Kit</b> (Kit de preparación de muestras de cfADN para cobas®) 24 pruebas (P/N: 07247737190)	<b>PK</b> (Proteinasa K) (P/N: 05860695102) Proteinasa K, liofilizada	2 x 100 mg	 <p>Peligro                      H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión e inhalación.                      H315: Provoca irritación cutánea.                      H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.                      H318: Provoca lesiones oculares graves.                      H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.                      H335: Puede irritar las vías respiratorias.                      P261: Evitar respirar el polvo/el humo/ el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.                      P280: Llevar guantes/prendas/gafas/ máscara de protección.                      P284 Llevar equipo de protección respiratoria.                      P305 + P351 + P338 + P310: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.                      Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.                      P342 + P311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.                      P362 + P364: Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.</p>
	<b>DNA PBB</b> (DNA Paraffin <sup>b</sup> Binding Buffer) (P/N: 05517621001) Tampón TRIS-HCl 49,6% de hidrocloreuro de guanidina 0,05% de urea 17,3% de Tritón X-100	8 x 10 ml	
	<b>WB I</b> (DNA Wash Buffer I) (P/N: 05517656001) Tampón TRIS-HCl 64% de hidrocloreuro de guanidina	1 x 25 ml	
	<b>WB II</b> (DNA Wash Buffer II) (P/N: 05517664001) Tampón TRIS-HCl Cloruro sódico	1 x 12,5 ml	
	<b>DNA EB</b> (DNA Elution Buffer) (P/N: 05517630001) Tampón TRIS-HCl 0,09% de azida sódica	1 x 6 ml	
	<b>HPEA FT</b> (High Pure Extension Assembly Unit) (P/N: 07323204102) Tubos de filtrado con tapones	5 x 5 ud.	
	<b>CT</b> (Tubos de obtención de muestras) (P/N: 05880513001)	3 x 25 ud.	

7817



APARTADO B: Para uso con muestras de plasma

cobas® EGFR Mutation Test v2

Kit/Casotes	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia <sup>o</sup>
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit (Kit de la prueba de mutación en EGFR de cobas®) 24 pruebas (P/N: 07248563190)	<b>EGFR MMX-1</b> (EGFR Master Mix 1) (P/N: 06471366001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A
	<b>EGFR MMX-2</b> (EGFR Master Mix 2) (P/N: 06471382001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A
	<b>EGFR MMX-3 v2</b> (EGFR Master Mix 3) (P/N: 07248601001) Tampón Tris Cloruro potásico Glicerol EDTA Tween 20 3,13% de sulfóxido de dimetilo 0,09% de azida sódica < 0,10% de dNTP < 0,01% de ADN polimerasa Z05-AS1 (microbiana) < 0,01% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) (microbiana) < 0,01% de aptámero < 0,01% de cebadores ascendente y descendente del EGFR < 0,01% de sondas EGFR con marcador fluorescente	2 x 0,48 ml	N/A

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

41

  
**ROBERTA WELE MAZZA**  
 PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. s.l.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 DIRECTORA TÉCNICA

Kit/Casets	Componentes e ingredientes de los reactivos	Cantidad por prueba	Símbolo de seguridad y advertencia <sup>a</sup>
<b>cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit</b> (Kit de la prueba de mutación en EGFR de cobas®) 24 pruebas (P/N: 07248563190)	<b>MGAC</b> (Acetato de magnesio) (P/N: 05854326001) Acetato de magnesio 0,09% de azida sódica	6 x 0,2 ml	N/A
	<b>EGFR MC</b> (EGFR Mutant Control) (P/N: 06471455001) Tampón Tris EDTA ARN poli-Ar (sintético) 0,05% de azida sódica < 0,1% de ADN plasmídico que contiene secuencias del exón 18, 19, 20 y 21 del EGFR (microbianas) < 0,1% de ADN EGFR no mutado (cultivo celular)	6 x 0,1 ml	N/A
	<b>DNA SD</b> (DNA Specimen Diluent) (P/N: 05854474001) Tampón TRIS-HCl 0,09% de azida sódica	2 x 3,5 ml	N/A

<sup>a</sup> Las etiquetas de seguridad del producto se basan fundamentalmente en la regulación GHS de la UE.

<sup>b</sup> El tampón de unión en parafina se utiliza para las muestras de plasma.

E

7817



APARTADO B: Para uso con muestras de plasma

cobas® EGFR Mutation Test v2

## Almacenamiento y manipulación de los reactivos

Reactivo	Temperatura de almacenamiento	Periodo de almacenamiento
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Entre 15 °C y 30 °C	Una vez abierto y reconstituido, el reactivo PK se mantiene estable durante 30 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero. Una vez abiertos y reconstituidos, los reactivos restantes del kit de preparación de muestras de cfADN se mantienen estables durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.
cobas® EGFR Mutation Test v2*	Entre 2 °C y 8 °C	Cuando se abre un reactivo, el kit se mantiene estable para 4 usos durante 90 días o hasta la fecha de caducidad indicada, lo que se produzca primero.

Nota: a excepción del reactivo PK, no congele los reactivos.

\* Los reactivos **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** y la solución MMX de trabajo (preparada añadiendo **MGAC** a **EGFR MMX-1** o **EGFR MMX-2** o **EGFR MMX-3 v2**) deben protegerse de la exposición a la luz. La mezcla MMX de trabajo debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad. Las muestras preparadas y los controles deben añadirse como máximo 1 hora después de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. La amplificación se debe iniciar como máximo 1 hora después de la adición de las muestras preparadas y los controles a la mezcla MMX de trabajo.

## Material adicional necesario

Material	P/N
Etanol absoluto (prueba 200, para biología molecular)	Sigma E7023 o Fisher Scientific BP2818-500, o equivalente
Isopropanol (ACS, > 99,5%)	Sigma 190764 o Fisher Scientific A451-1, o equivalente
Agua estéril libre de nucleasas (para biología molecular)	Applied Biosystems (Ambion) AM9937 o GE Healthcare Hyclone™ SH3053801, o equivalente
Lejía	Cualquier proveedor
Etanol al 70%	Cualquier proveedor
Pipetas serológicas estériles y desechables de 5 ml y 25 ml	Cualquier proveedor
Microplaca (placa de amplificación y detección) y película de sellado para el cobas® 4800 System	Roche 05232724001
Aplicador de película de sellado para el cobas® 4800 System (suministrado con la instalación del cobas® 4800 System)	Roche 04900383001
Pipeteadores ajustables* (capacidad de pipeteo entre 5 y 1.000 µl)	Cualquier proveedor
Puntas de pipeta exentas de DNasa con filtro para aerosol o de desplazamiento positivo	Cualquier proveedor
Pipet-Aid™*	Drummond 4-000-100, o equivalente
Centrífuga de mesa* (centrifugado a 6.000 x g y capacidad para tubos cónicos de 50 ml)	Eppendorf modelo 5810) o equivalente
Microcentrífuga de mesa de trabajo* (centrifugado a 20.000 x g)	Eppendorf 5430 o 5430R, o equivalente
Tubos cónicos de plástico estériles de 15 ml	Cualquier proveedor
Tubos para microcentrífuga (de 1,5 ml libres de RNasas/DNasas o grado PCR)	Life Technologies AM12400 o Eppendorf 022364120, o equivalente
Bandejas de tubos para microcentrífuga y cónicos	Cualquier proveedor
Agitador vórtex*	Cualquier proveedor
Guantes de laboratorio desechables sin talco	Cualquier proveedor

\* Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, según lo establecido en las instrucciones del fabricante.

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

43

Fam. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e.l.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 cc - FIRESTAR TECNICA

## Equipos y programas necesarios pero no suministrados

Equipos y programas necesarios, no suministrados
cobas z 480 analyzer
Unidad de control del cobas® 4800 System con software del sistema versión 2.1 o posterior
Software del paquete de análisis de plasma EGFR versión 1.0 o posterior
Lector de códigos de barras ext. por USB
Impresora (p. ej., HP P2055d)

Para obtener más información sobre el material de venta independiente, póngase en contacto con su representante local de Roche.

## Precauciones y requisitos de manipulación

### Advertencias y precauciones

Como sucede con cualquier procedimiento analítico, resulta esencial seguir las buenas prácticas de laboratorio recomendadas para obtener un rendimiento correcto del ensayo.

- Para diagnóstico in vitro exclusivamente.
- Puede solicitar Hojas de Datos de Seguridad (Safety Data Sheets, SDS) en las oficinas locales de Roche.
- Todas las muestras deben tratarse como material infeccioso, por lo que deben aplicarse procedimientos de laboratorio recomendados como los descritos en la publicación Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>8</sup> y en el documento M29-A4 del CLSI<sup>9</sup>.
- El reactivo DNA PBB contiene Tritón X-100, un irritante de las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y las membranas mucosas.
- Se recomienda la utilización de pipetas estériles desechables y puntas de pipetas exentas de DNasa.

### Buenas prácticas de laboratorio

- No pipetee con la boca.
- No se debe comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo del laboratorio.
- Lávese a conciencia las manos después de manipular las muestras y los reactivos del kit.
- Utilice guantes de laboratorio, batas de laboratorio y protección ocular cuando manipule los reactivos. Evite el contacto de estos materiales con la piel, los ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la zona afectada con abundante agua. Pueden producirse quemaduras si no se actúa adecuadamente. Si se producen derrames, diluya las manchas con agua antes de secarlas con un paño.
- Limpie y desinfecte minuciosamente todas las superficies de trabajo del laboratorio usando una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 0,5% en agua destilada o desionizada (lejía doméstica diluida a 1:10). A continuación, límpielas con un trapo impregnado en etanol al 70%.

**Nota:** *la lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25%. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.*

## Contaminación

- A fin de evitar la contaminación, es obligatorio el uso de guantes durante la manipulación de las muestras y los reactivos para la prueba cobas® EGFR, así como cambiarse los guantes entre un proceso y otro. Evite la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras.
- Cámbiese los guantes con frecuencia para reducir las posibilidades de contaminación.
- Cámbiese los guantes antes de salir de las áreas de aislamiento de ADN o si entra en contacto con soluciones o una muestra que pudieran estar contaminadas.
- Evite la contaminación microbiana y con ribonucleasa de los reactivos.
- El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Los materiales y equipos utilizados deben dedicarse exclusivamente a cada actividad y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. Por ejemplo, los pipeteadores y suministros para el aislamiento de ADN no deben utilizarse para preparar reactivos para la amplificación y la detección.
- Se recomienda utilizar flujos de trabajo de laboratorio unidireccionales y completar una actividad antes de pasar a la siguiente. Por ejemplo, debe completarse el aislamiento de ADN antes de empezar con el proceso de amplificación y detección. El aislamiento de ADN debe realizarse en una zona distinta de en la que se lleve a cabo la amplificación y la detección. Para evitar la contaminación de la solución Master Mix de trabajo con muestras de ADN, el área de trabajo de amplificación y detección debería limpiarse exhaustivamente antes de la preparación de la Master Mix de trabajo.

## Integridad

- No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de kits o lotes distintos.
- No utilice elementos desechables caducados.
- Los elementos desechables son de un solo uso. No deben reutilizarse.
- Debe realizarse un correcto mantenimiento del equipo, de acuerdo con lo establecido en las instrucciones del fabricante.

## Eliminación de residuos

- Los reactivos DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC y DNA SD contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Cuando elimine soluciones que contengan azida sódica vertiéndolas en fregaderos de laboratorio, deje correr abundante agua fría para evitar la formación de depósitos de azida.
- Deseche los reactivos no utilizados y los residuos según la reglamentación nacional, federal, estatal y local.

E

J

### Limpieza de derrames

- Los reactivos DNA PBB y WB I contienen hidrocloreuro de guanidina. Si se vierte líquido que contenga este tampón, límpielo con detergente apto para laboratorio y agua. Si se vierte líquido que contenga agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada primero con detergente para laboratorio y agua y luego con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Si el derrame se produce sobre el cobas® 480 instrument, siga las instrucciones de limpieza que se detallan en el Manual del sistema correspondiente del cobas® 4800 System.
- No utilice soluciones de hipoclorito de sodio (lejía) para limpiar el cobas z 480 analyzer. Limpie el cobas z 480 analyzer según las instrucciones detalladas en el Manual del sistema correspondiente del cobas® 4800 System.
- Si desea conocer las advertencias, precauciones y procedimientos adicionales para reducir el riesgo de contaminación del cobas z 480 analyzer, consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer.

### Obtención, transporte y almacenamiento de las muestras

*Nota: manipule todas las muestras como si pudieran transmitir agentes infecciosos.*

#### Recogida y manipulación de muestras

El cobas® cfDNA Sample Preparation Kit se ha desarrollado para su uso con muestras de plasma con K2 EDTA.

El plasma debería separarse de la sangre durante las 4 horas posteriores a la extracción y almacenarse a una temperatura ≤ -70 °C hasta el momento de realización del análisis.

#### Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras

Las muestras de plasma pueden transportarse congeladas. El transporte de las muestras de plasma debe cumplir la reglamentación nacional, federal, estatal y local para el transporte de agentes etiológicos.<sup>10</sup>

<b>Temperatura de almacenamiento de las muestras de plasma</b>	≤ -70 °C	Entre 2 °C y 8 °C
<b>Periodo de almacenamiento</b>	Hasta 12 meses	Hasta 3 días

#### Almacenamiento y estabilidad de las muestras procesadas

La muestra procesada (ADN extraído) se mantiene estable como se indica a continuación:

<b>Temperatura de almacenamiento del ADN extraído</b>	Entre -15 °C y -25 °C	Entre 2 °C y 8 °C	Entre 15 °C y 30 °C
<b>Periodo de almacenamiento</b>	Hasta 1 ciclo de congelación/descongelación durante 60 días	Hasta 7 días	Hasta 1 día

El ADN extraído debería utilizarse en los periodos de almacenamiento recomendados o antes de la fecha de caducidad del cobas® cfDNA Sample Preparation Kit utilizado para la extracción del ADN, lo que ocurra primero.

## Procedimiento analítico

### Realización de la prueba

Ilustración 4 Flujo de trabajo de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 con el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

1	Inicie el sistema.
2	Efectúe el mantenimiento del equipo.
3	Extraiga las muestras y los reactivos del almacenamiento.
4	Prepare las muestras para su unión a la columna.
5	Lleve a cabo el aislamiento del ADN.
6	Eluya el ADN.
7	Cree la petición de trabajo e imprima la distribución de la placa.
8	Prepare los reactivos de amplificación.
9	Cargue la microplaca con los reactivos de amplificación.
10	Cargue la microplaca con muestras.
11	Selle la microplaca.
12	Cargue la microplaca en el cobas z 480 analyzer.
13	Inicie la serie analítica.
14	Revise los resultados.
15	Con LIS: envíe los resultados al LIS.
16	Descargue el analizador.

### Instrucciones de uso

**Nota:** para la prueba cobas® EGFR, sólo se pueden utilizar muestras de plasma con K2 EDTA.

**Nota:** consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer para obtener instrucciones de uso detalladas del cobas z 480 analyzer.

### Tamaño de la serie

Una única serie puede incluir entre 1 y 30 muestras (además de los controles) por cada microplaca de 96 pocillos. Si se analizan más de 24 muestras, será necesario utilizar varios kits de la prueba cobas® EGFR.

El kit de la prueba cobas® EGFR contiene reactivos suficientes para realizar 8 series de 3 muestras (además de los controles) para un máximo de 24 muestras por kit.

**Preparación y almacenamiento de los reactivos**

Prepare los reactivos de trabajo como se muestra en la tabla siguiente antes de utilizar el kit por primera vez. Utilice una pipeta serológica de 5 ml para dispensar el agua. Utilice pipetas serológicas de 25 ml para dispensar el etanol. Si la proteinasa K se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar.

Reactivos	Reconstitución/Preparación
Proteinasa K (PK)	Reconstituya el reactivo PK añadiendo 4,5 ml de agua estéril al vial con la ayuda de una pipeta serológica estéril y desechable de 5 ml. Mezcle el contenido invirtiendo el vial de 5 a 10 veces. Transfiera una parte alícuota de 1,1 ml de PK reconstituida a tubos para microcentrífuga de 1,5 ml y almacénelos a -20 °C durante un máximo de 30 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Si la PK se ha reconstituido y congelado previamente, descongele una cantidad suficiente de alícuotas para procesar el número de muestras que se van a analizar (se necesitan 250 µl de PK reconstituida para cada muestra).
Tampón de lavado I (WB I)	Prepare el tampón WB I de trabajo añadiendo 15 ml de etanol absoluto a la botella de WB I. Mezcle bien invirtiendo la botella entre 5 y 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB I a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.
Tampón de lavado II (WB II)	Prepare el tampón WB II de trabajo añadiendo 50 ml de etanol absoluto a la botella de WB II. Mezcle el contenido invirtiendo la botella de 5 a 10 veces. Anote en la botella que se ha añadido etanol y la fecha correspondiente. Almacene el reactivo WB II a una temperatura de entre 15 °C y 30 °C hasta 90 días o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra antes.

Todas las soluciones almacenadas a una temperatura comprendida entre 15 °C y 30 °C deben ser claras. Si detecta algún precipitado en los reactivos, caliente la solución a 37 °C hasta que se disuelva el precipitado. No utilice el reactivo hasta se haya disuelto el precipitado por completo.

**Procedimiento de aislamiento de ADN**

1. Etiquete un tubo cónico de 15 ml para cada muestra de plasma, y un control negativo. Puede utilizar agua estéril como control negativo, cuyo procesamiento es equivalente al de las muestras.
2. Agite el plasma y luego transfiera 2 ml de cada muestra de plasma o control negativo (agua estéril) a un tubo de 15 ml distinto.

*Nota: se necesita un mínimo de 2 ml de plasma para procesar una muestras con el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit.*

3. Añada 250 µl de PK a cada tubo.
4. Añada 2 ml de DNA PBB a cada tubo.
5. Mezcle los tubos de muestra que contengan DNA PBB/PK invirtiéndolos entre 3 y 5 veces.
6. Incube cada tubo a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante 30 minutos.

*Nota: durante la incubación, prepare el número necesario de tubos FT para HPEA. Para ello, etiquete cada tubo FT para HPEA con la identificación adecuada en el tapón de cada tubo FT para HPEA.*

*Nota: para cada muestra se necesita un tubo FT para HPEA, tres tubos de obtención (CT) y un tubo de elución (tubo para microcentrífuga de 1,5 ml).*

7817

**APARTADO B: Para uso con muestras de plasma**

cobas® EGFR Mutation Test v2

**Nota:** durante la incubación, etiquete el número requerido de tubos de elución (tubos para microcentrífuga de 1,5 ml) con la información de identificación de la muestra.

7. Añada 500 µl de isopropanol y mezcle el lisado mediante inversión entre 3 y 5 veces.
8. Transfiera todo el lisado al tubo FT para HPEA debidamente etiquetado.
9. Centrifugue los tubos FT para HPEA a 4.000 x g durante 5 minutos en la centrífuga de mesa.
10. Una vez finalizada la centrifugación, retire el tubo FT para HPEA del tubo de obtención cónico de 50 ml. Coloque el tubo FT para HPEA en un tubo CT. Retire el clip de bloqueo grande haciéndolo girar y luego estirando del mismo.
11. Retire el clip de bloqueo pequeño situado debajo del tapón del tubo de filtrado (FT) estirando del mismo hasta que se rompa el sello a ambos lados del tapón y, luego, extráigalo del conjunto.
12. Retire el HPEA del tubo FT inclinándolo y estirando el extensor del lateral del tubo FT.
13. Deseche el flujo del tubo FT para HPEA en un contenedor de residuos químicos y elimine adecuadamente la unidad.
14. Etiquete el tapón de filtrado adecuadamente.
15. Añada 500 µl de reactivo WB I de trabajo a cada tubo FT.

**Nota:** en la tabla del apartado "Preparación de los reactivos" se describe cómo preparar el reactivo WB I de trabajo.

16. Utilice la microcentrífuga de mesa de trabajo para los pasos restantes del protocolo.
17. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.
18. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo de cada tubo CT en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT anterior.
19. Añada 500 µl de reactivo WB II de trabajo a cada tubo FT.

**Nota:** en la tabla del apartado "Preparación de los reactivos" se describe cómo preparar el reactivo WB II de trabajo.

21. Centrifugue los tubos FT/CT a 8.000 x g durante 1 minuto.
22. Coloque cada tubo FT en un tubo CT nuevo. Deseche el flujo del tubo CT anterior en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT anterior como corresponde.
23. Centrifugue los tubos FT/CT a una velocidad comprendida entre 16.000 x g y 20.000 x g durante 1 minuto para secar la membrana del filtro.
24. Coloque el tubo FT en un tubo de elución (tubo para microcentrífuga exento de RNasa/DNasa de 1,5 ml) etiquetado previamente con la información de identificación de la muestra. Deseche el flujo de cada tubo CT en un contenedor de residuos químicos y elimine el CT anterior como corresponda.
25. Añada 100 µl de reactivo DNA EB en el centro de la membrana del tubo FT, pero sin tocarla.
26. Incube los tubos FT con un tubo de elución a temperatura ambiente (entre 15 °C y 30 °C) durante 5 minutos.
27. Centrifugue el tubo FT con el tubo de elución a 8.000 x g durante 1 minuto para recoger la solución de elución en el tubo de elución (tubo para microcentrífuga de 1,5 ml exento de RNasa/DNasa, previamente etiquetado). La solución de elución es el stock de ADN. Agite la solución de elución antes de utilizarla.
28. Deseche el tubo FT. Cierre los tapones de los tubos de elución.
29. El stock de ADN está preparado para realizar las pruebas de PCR después de la agitación. Almacene el stock de ADN según las instrucciones del apartado **Transporte, almacenamiento y estabilidad de las muestras**.

**Amplificación y detección**

**Nota:** para evitar la contaminación de las mezclas MMX de trabajo con muestras de ADN, la amplificación y la detección deben realizarse en un área distinta de la de aislamiento de ADN. El área de trabajo de amplificación y detección debe limpiarse minuciosamente antes de la preparación de la mezcla MMX de trabajo. Para llevar a cabo una limpieza adecuada, es necesario limpiar todas las superficies, incluidos pipeteadores y bandejas, primero con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y luego con una solución de etanol al 70%. La lejía doméstica comercial contiene normalmente hipoclorito de sodio en una concentración del 5,25%. Mediante dilución en proporción 1:10 de la lejía doméstica se obtendrá una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

**Configuración del equipo**

Consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer para obtener instrucciones detalladas sobre cómo configurar el analizador.

**Configuración de las peticiones de pruebas**

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR, consulte el Manual del equipo del cobas z 480 analyzer del cobas® 4800 System y el Manual de usuario de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2.

Cree un esquema de placas con la posición de todas las muestras y controles de la serie. El control de mutación se carga en las posiciones A01-A03 de la placa. El control negativo se carga en las posiciones B01-B03 de la placa. A continuación, se añaden las muestras diluidas en juegos de 3 columnas, comenzando por C01-C03 hasta H09-H12, tal como se indica en la Ilustración 5.

**Ilustración 5 Distribución de la placa para la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2**

Fila / Columna	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

Donde: MC = Control de mutación, NEG = Control negativo, S n.º = ID de muestra, y MMX n.º corresponde al reactivo de Master Mix 1, 2 ó 3 v2.

**Nota:** cualquiera de las muestras debe aparecer en tres columnas consecutivas de una fila para obtener una respuesta.

**Nota:** la solución Master Mix 1 de trabajo se debe cargar en las columnas 01, 04, 07 y 10 de la placa. La solución Master Mix 2 de trabajo se debe cargar en las columnas 02, 05, 08 y 11 de la placa. La solución Master Mix 3 de trabajo v2 se debe cargar en las columnas 03, 06, 09 y 12 de la placa.

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

7817



**APARTADO B: Para uso con muestras de plasma**

**cobas<sup>®</sup> EGFR Mutation Test V2**

**Nota:** *se pueden cargar hasta 30 muestras en una única placa. Si se necesita más de un kit de reactivo para procesar todas las muestras de la placa, entonces todos los kits deberán pertenecer al mismo lote.*

**Configuración del equipo**

1. Encienda el cobas z 480 analyzer. El equipo puede tardar varios minutos en calentarse antes de poder empezar la serie.
2. Encienda la unidad de control. La unidad de control inicia sesión en Windows automáticamente.
3. Haga doble clic en el icono del cobas<sup>®</sup> 4800 software e inicie sesión para llevar a cabo la serie mediante el ID de usuario y la contraseña específicos del laboratorio.
4. Haga clic en el icono "New Run" del menú.
5. Se abrirá la ventana emergente "Select Test". Seleccione la prueba de plasma EGFR y haga clic en el botón "OK".
6. Cuando aparezca la pantalla "Work Place", escriba el código de barras de la MWP en el campo para la identificación de la microplaca, o bien escanéelo. Escanee los códigos de barras para la identificación del kit de aislamiento de ADN y el kit de reactivos de la prueba de mutación en EGFR de cobas<sup>®</sup> para introducirlos en los campos correspondientes. En el campo "Sample", introduzca "24" para el primer kit y "6" para el segundo (si desea ejecutar una placa completa de 30 muestras). Si desea analizar menos de 24 muestras, introduzca el número correspondiente en el campo de muestras de la primera fila.
7. El campo "Sample ID" se rellena automáticamente para las posiciones de control. Escriba el ID de muestra exclusivo de cada una de las muestras en la columna de identificación de la muestra, o bien escanéelo.
8. Una vez introducidos los ID de muestra, seleccione el botón "Save" ubicado en la esquina inferior izquierda de la pantalla.
9. Guarde el archivo con el nombre predeterminado asignado por el software.
10. Cree una distribución de placa con la posición de todas las muestras y controles de la serie. Para ello, haga clic en el botón "Print" y seleccione "File" -> "Print" en la ventana de vista previa. Rellene siempre la placa por columnas, comenzando por el control EGFR MC en las posiciones de la A01 a la A03 y el control NEG en las posiciones de la B01 a la B03. Distribuya las muestras comenzando por las posiciones de la C01 a la C03 y continúe hacia abajo hasta las posiciones de la H01 a la H03; a continuación, proceda con las posiciones de la A04 a la A06 y continúe hacia abajo hasta las posiciones de la H04 a la H06 hasta distribuir todas las muestras (Ilustración 2).

**Configuración de las reacciones**

**Preparación de las Master Mix de trabajo (MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2)**

**Nota:** *las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MMX de trabajo son sensibles a la luz y se deben proteger de la exposición a la luz.*

**Nota:** *debido a la viscosidad de las mezclas EGFR y la mezcla MMX de trabajo, realice el pipeteado lentamente para asegurarse de que dispensa completamente la muestra por la punta.*

**Nota:** *las mezclas EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 y EGFR MMX-3 v2 pueden adquirir un aspecto azul claro/púrpura. Esto no afecta el rendimiento del reactivo.*

Prepare tres mezclas MMX de trabajo a granel, una con EGFR MMX-1, otra con EGFR MMX-2 y la tercera con EGFR MMX-3 v2 en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml individuales.

1. Calcule el volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario para cada solución MMX de trabajo con la siguiente fórmula:

Volumen de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 necesario = (número de muestras + 2 controles + 1) x 20 µl

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

ROBERTA MELE DIAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A. Q. O. J.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CO - DIRECTORA TÉCNICA

2. Calcule el volumen de MGAC necesario para cada mezcla MMX de trabajo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de MGAC necesario} = (\text{número de muestras} + 2 \text{ controles} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Utilice la Tabla 12 para determinar el volumen necesario de cada reactivo para la preparación de la mezcla MMX de trabajo a partir del número de muestras incluidas en cada serie.

**Tabla 12 Volúmenes de reactivos necesarios para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo**

		N.º muestras*									
		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
Vol. total para cada MMX de trabajo (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

\* Los volúmenes para el número de muestras se calculan a partir de la suma del número de muestras + 2 controles + 1

3. Retire el número de viales de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 y MGAC necesario de la nevera a una temperatura entre 2 °C y 8 °C. Agite cada reactivo durante 5 segundos y espere a que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo. Etiquete un tubo para microcentrífuga estéril para la mezcla MMX-1 de trabajo, MMX-2 de trabajo y MMX-3 v2 de trabajo.
4. Añada el volumen calculado de EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 o EGFR MMX-3 v2 al tubo de MMX de trabajo correspondiente.
5. Añada el volumen calculado de MGAC a los tubos de MMX de trabajo.
6. Mezcle el contenido de los tubos mediante un agitador vórtex durante un intervalo de 3 a 5 segundos para obtener una mezcla adecuada.

**Nota:** las muestras y los controles deben añadirse a la microplaca (placa de amplificación y detección) durante la hora siguiente a la preparación de las mezclas de trabajo MMX.

**Nota:** utilice únicamente microplacas (placas de amplificación y detección) y películas de sellado para el cobas® 4800 System.

### Preparación de la placa

1. Pipetee 25 µl de mezcla MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la microplaca (placa de amplificación y detección) necesario para la serie. No permita que la punta del pipeteador toque la parte exterior de la placa del pocillo.
  - Añada MMX-1 de trabajo (que contiene EGFR MMX-1) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 01, 04, 07 y 10, según sea necesario.
  - Añada MMX-2 de trabajo (que contiene EGFR MMX-2) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 02, 05, 08 y 11, según sea necesario.
  - Añada MMX-3 v2 de trabajo (que contiene EGFR MMX-3 v2) a los pocillos de la microplaca (placa de amplificación y detección) de las columnas 03, 06, 09 y 12, según sea necesario.
2. Pipetee 25 µl de EGFR MC en los pocillos A01, A02 y A03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.
3. Con una punta de pipeteador nueva, pipetee 25 µl de NEG en los pocillos B01, B02 y B03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) y utilice una pipeta para mezclar bien la solución y aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces.

781



**APARTADO B: Para uso con muestras de plasma**

**cobas® EGFR Mutation Test v2**

**Nota:** *cada serie debe contener un control positivo (EGFR MC) en los pocillos A01, A02 y A03, y un control negativo (NEG) en los pocillos B01, B02 y B03. En caso contrario, el cobas z 480 analyzer invalidará la serie.*

**Nota:** *cámbiese los guantes según sea necesario para evitar la contaminación entre muestras y en el exterior de los tubos para reacción de la PCR.*

4. Con puntas de pipeteador nuevas para cada ADN de muestra, añada 25 µl del primer ADN de la muestra a los pocillos C01, C02 y C03 de la microplaca (placa de amplificación y detección) con una punta nueva para la adición del ADN de la muestra a cada pocillo y mezcle la solución en cada pocillo con una pipeta para aspirarla y dispensarla en el pocillo un mínimo de dos veces. Repita este procedimiento con el ADN de las segundas muestras (pocillos D01, D02 y D03). Siga la plantilla de la ilustración 2 hasta que todo el ADN de las muestras esté cargado en la microplaca (placa de amplificación y detección). Asegúrese de que todo el líquido se deposite en la parte inferior de los pocillos.
5. Tape la microplaca (placa de amplificación y detección) con la película de sellado (suministrada con las placas). Utilice el sellador para sellar bien la película en la microplaca (placa de amplificación y detección).
6. Compruebe que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la PCR.

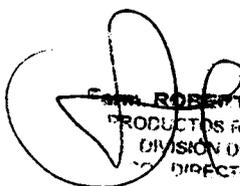
**Nota:** *los procesos de amplificación y detección deben iniciarse en el plazo de 1 hora después de añadir la primera dilución de ADN de la muestra a la mezcla MMX de trabajo.*

**Inicio de la PCR**

Consulte el Manual de usuario de cobas® EGFR para obtener instrucciones detalladas sobre los pasos del flujo de trabajo de EGFR.

E

7

  
ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A.O. S.R.L.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
DIRECTOR TECNICO

## Resultados

### Interpretación de los resultados

**Nota:** la validación de las series y las muestras la lleva a cabo el cobas® 4800 software.

**Nota:** una prueba válida puede incluir resultados de muestras tanto válidos como no válidos.

En las series consideradas válidas, los resultados de las muestras se interpretan tal como se indica en la Tabla 13.

**Tabla 13 Interpretación de los resultados de la prueba cobas® EGFR**

Resultado de la prueba	Resultado de la mutación	Resultado del índice semicuantitativo (SQI)	Interpretación
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Puede existir más de una mutación)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (Puede existir más de una mutación)	Se ha detectado una mutación en la región del EGFR objetivo de la prueba especificada.
No Mutation Detected (NMD)*	N/A	N/A	No se ha detectado ninguna mutación en las regiones del EGFR analizadas.
Invalid	N/A	N/A	El resultado de la muestra no es válido. Repita el análisis de las muestras cuyos resultados no sean válidos según las instrucciones que encontrará en el apartado "Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos" que figura más adelante.
Failed	N/A	N/A	Serie errónea debido a un problema de hardware o software. Póngase en contacto con su oficina de Roche para recibir asistencia técnica.

\* Un resultado "No Mutation Detected" no excluye la presencia de una mutación en las regiones del EGFR analizadas porque los resultados dependen de la concentración de secuencias mutadas, de una correcta integridad de las muestras, de la ausencia de inhibidores y de que haya ADN suficiente para la detección.

### Índice semicuantitativo (SQI)

El SQI es una medida semicuantitativa que indica la cantidad de cfDNA mutado presente en una muestra y que se puede utilizar para medir las diferencias de la mutación en el tiempo. Un incremento en el valor del SQI indica un incremento en la cantidad de la mutación del fragmento objetivo correspondiente dentro de una muestra de origen individual, mientras que un descenso en el valor del SQI indica un descenso en la cantidad total de la mutación del fragmento objetivo correspondiente dentro de una muestra de origen individual.

7817



## Reanálisis de muestras cuyos resultados no son válidos

1. Si la serie no es válida, no habrá volumen suficiente de ADN extraído para repetir la amplificación y la detección en cada muestra. Repita el procedimiento completo de la prueba con todas las muestras, empezando por el aislamiento de ADN.
2. Si la serie es válida pero la muestra no lo es, no habrá volumen suficiente de ADN extraído para repetir la amplificación y la detección en cada muestra. Repita el procedimiento completo de la prueba con la muestra no válida, empezando por el aislamiento de ADN.

## Control de calidad y validez de los resultados

Para cada serie con un máximo de 30 muestras se incluye un juego de control de mutación en EGFR de cobas® (EGFR MC) (pocillos A01, A02 y A03) y un control negativo (NEG) (pocillos B01, B02 y B03) para las soluciones MMX-1, MMX-2 y MMX-3 v2 de trabajo. Una serie se considera válida cuando el control de mutación EGFR (EGFR MC) y los pocillos del control negativo (NEG) también son válidos. Si un control de mutación en EGFR (EGFR MC) o un control negativo (NEG) no es válido, toda la serie se considera no válida y debe repetirse.

### Control de mutación

El resultado del control de mutación en EGFR (EGFR MC) debe ser "Valid". Si los resultados de EGFR MC no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

### Control negativo

El resultado del control negativo (NEG) debe ser "Valid". Si los resultados de NEG no son válidos de forma recurrente, póngase en contacto con su oficina local de Roche para recibir asistencia técnica.

## Limitaciones del procedimiento

1. La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 se verificó con muestras de plasma con K2 EDTA.
2. El rendimiento de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 se verificó mediante el cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 07247737190) con muestras de plasma con K2 EDTA.
3. La detección de una mutación depende del número de copias presentes en la muestra, que puede verse afectado por la integridad de la muestra, el volumen de ADN aislado y la presencia de sustancias interferentes.
4. La obtención de resultados fiables depende de que el transporte, el almacenamiento y el procesamiento sean adecuados. Siga los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso y en el Manual de usuario de cobas® EGFR.
5. La incorporación de la enzima AmpErase a la Master Mix de la prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 permite realizar una amplificación selectiva del ADN objetivo; no obstante, es imprescindible utilizar buenas prácticas de laboratorio y cumplir estrictamente los procedimientos especificados en estas Instrucciones de uso para evitar la contaminación de los reactivos.
6. El uso de este producto debe limitarse al personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y la utilización del cobas® 4800 System.
7. Solamente cobas z 480 analyzer se ha validado para su uso con este producto. No utilice ningún otro termociclador con detección óptica en tiempo real con este producto.
8. Debido a las diferencias específicas entre tecnologías, se recomienda a los usuarios que, antes de cambiar de una a otra, realicen estudios de correlación en el laboratorio para determinar las diferencias tecnológicas.
9. Aunque es poco probable, las mutaciones en las regiones del ADN genómico del gen EGFR cubiertas por los cebadores o las sondas de la prueba cobas® EGFR pueden causar errores en la detección de la presencia de una mutación en los exones 18, 19, 20 y 21 (resultados "Mutation Not Detected").

10. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos.
11. Las muestras analizadas fuera del intervalo lineal del ensayo pueden generar resultados falsos.
12. La prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 se ha comprobado para su uso con 25 µl de stock de ADN por pocillo de reacción. No se recomienda introducir volúmenes de stock de ADN inferiores a 25 µl por pocillo de reacción.
13. Debe seguirse el procedimiento descrito anteriormente para detectar una cantidad  $\geq 100$  copias de ADN mutado por ml de plasma conservado en K2 EDTA para las mutaciones en EGFR de la Tabla 1.
14. Es posible que las muestras con resultados "No Mutation Detected" contengan mutaciones en EGFR que el ensayo no detecta.
15. Es necesario revisar los resultados "No Mutation Detected" en plasma mediante la realización de pruebas de tejidos de comprobación o confirmación.
16. La prueba cobas® EGFR presenta reactividad cruzada (resultados "Mutation Detected") con la mutación L747S del exón 19, una mutación adquirida poco frecuente que puede presentar resistencia al tratamiento con TKI.<sup>11</sup>



## Evaluación no clínica del rendimiento

Los datos siguientes tienen como objetivo demostrar el rendimiento analítico de la prueba cobas® EGFR.

### Límite de detección mediante ADN de línea celular

Se añadieron ADN de líneas celulares que contenían las siete clases de mutación detectadas por la prueba a plasma conservado en K2 EDTA de donantes sanos de EGFR no mutado. Se prepararon diluciones en serie y se analizaron 24 réplicas de cada miembro del panel utilizando cada uno de los tres lotes del kit de la prueba cobas® EGFR.

El límite de detección se determinó para cada una de las siete clases de mutación detectadas por la prueba como la concentración de ADN más baja que generó un resultado "Mutation Detected" para EGFR de como mínimo un 95% para la mutación analizada. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14 Límite de detección de la prueba cobas® EGFR con plasma conservado en K2 EDTA**

Exón del EGFR	Mutación en EGFR	Secuencia de ácidos nucleicos analizada	LOD de ADN intacto* (copias/ml)	LOD de ADN cortado** (copias/ml)
18	G719A	2156G>C	100	100
19	Ex19Del	2235_2249del15	25	75
20	S768I	2303G>T	20	25
20	T790M	2369C>T	25	100
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	80	25
21	L858R	2573T>G	10	100
21	L861Q	2582T>A	30	30

Las diferencias en el LOD observado se deben a la diferencia en el ADN de fondo.

\*El ADN de línea celular intacto presentó un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 1.000 copias/ml.

\*\*El ADN de línea celular, cortado mecánicamente a un tamaño medio de 200 bp, presentó un fondo de ADN no mutado de aproximadamente 10.000 copias/ml.

Este estudio demuestra que la prueba cobas® EGFR es capaz de detectar mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR con una cantidad  $\leq 100$  copias de ADN mutado por ml de plasma si se utiliza el volumen estándar de 25  $\mu$ l de stock de ADN por pocillo de reacción.

## Correlación con MiSeq a partir de muestras clínicas de plasma conservadas en K2 EDTA

Para evaluar la capacidad del ensayo a la hora de identificar correctamente mutaciones de EGFR en plasma, se realizó el análisis comparativo de 74 muestras conservadas en K2 EDTA provenientes de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) mediante la prueba cobas® EGFR y la plataforma de secuenciación MiSeq de Illumina (MiSeq) (Tabla 15).

**Tabla 15 Prueba de mutación en EGFR de cobas® v2 y secuenciación MiSeq**

Medida de concordancia	Concordancia de porcentaje (n)	IC del 95%
Concordancia de porcentaje de positivos (PPA)	80,0% (28/35)	70,3-83,7%
Concordancia de porcentaje de negativos (NPA)	94,9% (37/39)	83,1-98,6%
Concordancia de porcentaje general (OPA)	87,8% (65/74)	81,2-90,7%

## Linealidad

El estudio de linealidad de la prueba cobas® EGFR se llevó a cabo con una serie de diluciones formadas por un panel de al menos 8 miembros con el que se cubría el intervalo lineal de la mutación predominante para cada una de las clases de mutación de EGFR detectadas por la prueba. Los miembros del panel se prepararon diluyendo ADN de líneas celulares que contenían cada una de las mutaciones predominantes en plasma conservado en K2 EDTA de donantes sanos de EGFR no mutado. La evaluación se realizó según las directrices del EP06-AE del CLSI.<sup>16</sup> Se analizaron diez réplicas por miembro del panel para cada 2 lotes en concentraciones de hasta 1,0E+04 copias/ml (20 réplicas totales por nivel). Por encima de 1,0E+04 copias/ml, se analizó una réplica por lote.

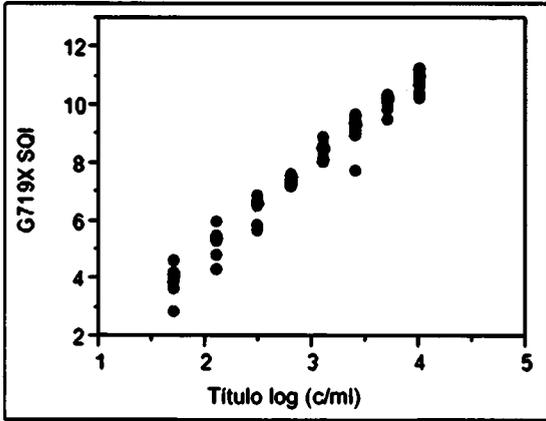
Para cada una de las clases de mutación de la prueba cobas® EGFR, se indica el intervalo lineal en la Tabla 16 y se muestran los gráficos correspondientes a un lote en las ilustraciones de la Ilustración 6 a la Ilustración 12.

**Tabla 16 Intervalo lineal de la prueba cobas® EGFR con plasma conservado en K2 EDTA**

Exón del EGFR	Mutación en EGFR	Secuencia de ácidos nucleicos analizada	Intervalo lineal (copias/ml)
18	G719A	2156 G>C	50-1E+04
19	Delección en el exón 19	2235_2249del15	10-1E+05
20	S768I	2303G>T	10-1E+05
20	T790M	2369C>T	50-1E+05
20	Inserción en el exón 20	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10-1E+05
21	L858R	2573T>G	10-1E+05
21	L861Q	2582T>A	10-1E+05

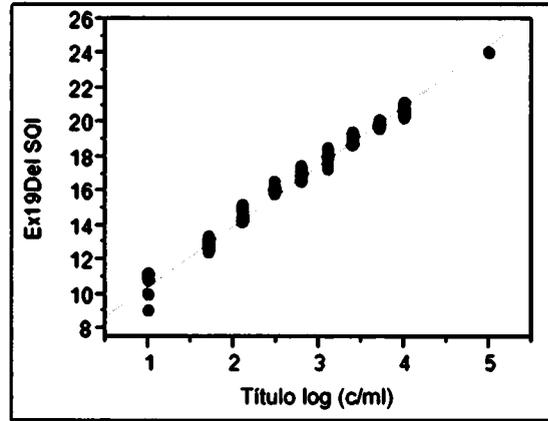
5

**Ilustración 6** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular G719A



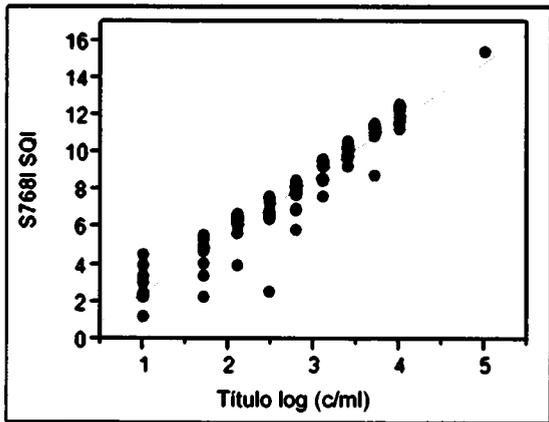
$SQI = -0,987 + 2,986 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,968$

**Ilustración 7** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular Ex19Del



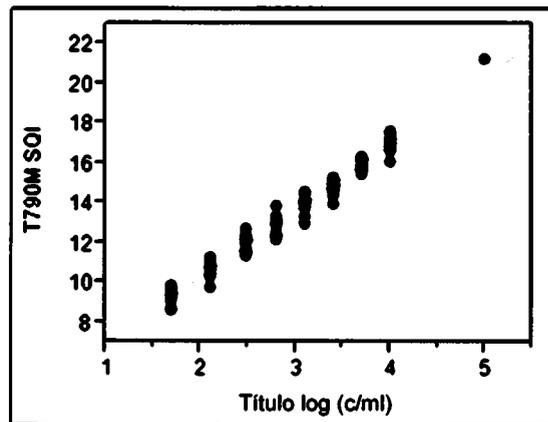
$SQI = 7,042 + 3,507 * \text{copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,981$

**Ilustración 8** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular S768I



$SQI = -0,578 + 3,093 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,912$

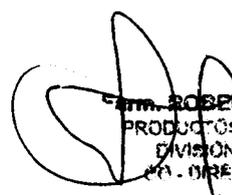
**Ilustración 9** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular T790M



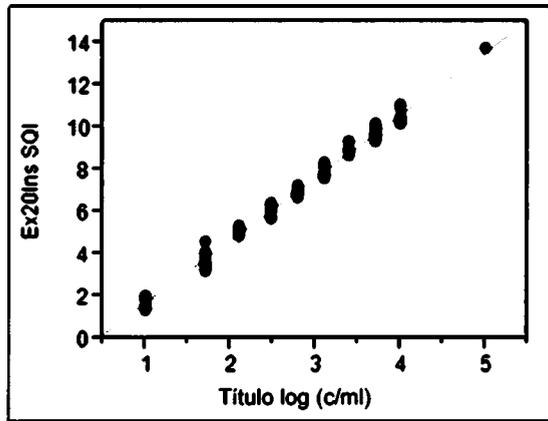
$SQI = 3,593 + 3,352 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,973$

E

A

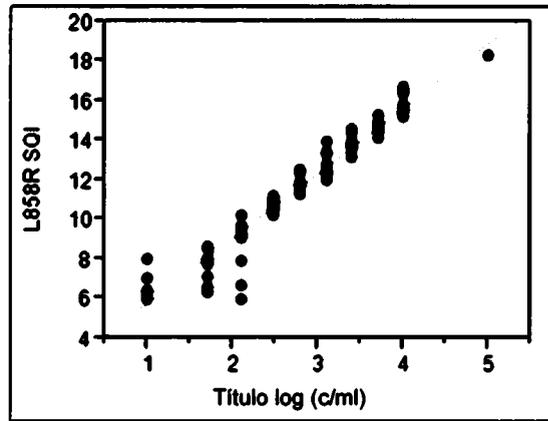
  
**Roberta Mele Mazza**  
 PRODUCTOS ROCHE S.A. de C.V.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 CA - DIRECTORA TÉCNICA

**Ilustración 10** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular Ex20Ins



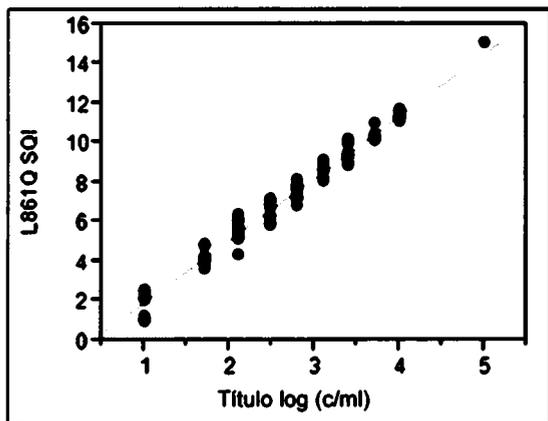
$SQI = -1,268 + 2,973 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,990$

**Ilustración 11** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular L858R



$SQI = 2,543 + 3,283 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,933$

**Ilustración 12** Linealidad del ADN mutado en plasma conservado en K2 EDTA: ADN de línea celular L861Q



$SQI = -1,177 + 3,149 * \text{Copias por ml de log}$   
 $R^2 = 0,980$

E

7817



APARTADO B: Para uso con muestras de plasma

cobas® EGFR Mutation Test v2

## Repetibilidad

La repetibilidad de la prueba cobas® EGFR se valoró mediante diluciones de ADN de línea celular de EGFR mutado diluido en muestras de plasma conservado en K2 EDTA provenientes de donantes sanos. Las mutaciones predominantes de cada una de las clases detectadas por la prueba se codiluyeron y se valoraron con una concentración de 3x el LoD respectivo para cada mutación (en copias/ml), 1,0E+03 copias/ml y 5,0E+04 copias/ml. Se analizó además una muestra no mutada. Cada una de las 4 muestras se analizó por duplicado por parte de dos usuarios, utilizando dos lotes de reactivos distintos y dos cobas z 480 analyzers durante 4 días. La prueba cobas® EGFR presenta una tasa de identificación correcta del 99,2% (381/384).

La Tabla 17 indica el SQI medio y el SD del SQI del estudio de repetibilidad.

Tabla 17 SQI medio y SD del SQI del estudio de repetibilidad

Exón del EGFR	Mutación en EGFR	Secuencia de ácidos nucleicos analizada	Concentración (copias/ml)	SQI medio	SD del 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

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

61

  
 FIRM. ROBERTA MELE MAZZA  
 PRODUCTOS ROCHE S.A. S. I.  
 DIVISION DIAGNOSTICA  
 CO - DIRETORIA TECNICA

## Información adicional

### Símbolos

Los símbolos siguientes se emplean en el rotulado de todos los productos de diagnóstico por PCR de Roche.

**Tabla 18** Símbolos utilizados en las etiquetas de los productos para diagnóstico mediante PCR de Roche

	Programa auxiliar		Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Límite inferior del intervalo asignado
	Hoja de datos del código de barras		Fabricante
	Código de lote		Almacenar en la oscuridad
	Riesgo biológico		Suficiente para <n> pruebas
	Número de catálogo		Límite de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso		Archivo de definición de pruebas
	Contenido del kit		Límite superior del intervalo asignado
	Distribuido por		Usar antes de
	Para evaluación del rendimiento IVD únicamente		Número mundial de artículo comercial

 El presente producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79/CE de productos sanitarios para el diagnóstico *in vitro*.

Servicio técnico para clientes de EE. UU.: 1-800-526-1247

7817



**APARTADO B: Para uso con muestras de plasma**

**cobas® EGFR Mutation Test V2**

## Fabricante y distribuidores

**Tabla 19** Fabricante y distribuidores



Fabricado en los Estados Unidos  
Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
Industriestrasse 7  
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL  
Avda. Generalitat, 171-173  
E-08174 Sant Cugat del Vallès  
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.  
Av. Engenheiro Billings, 1729  
Jaguará, Building 10  
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics  
9115 Hague Road  
Indianapolis, IN 46250-0457 USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center  
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics  
201, boulevard Armand-Frappier  
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877-273-3433)

Roche Diagnostics  
2, Avenue du Vercors  
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics S.p.A.  
Viale G. B. Stucchi 110  
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:  
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.  
Estrada Nacional, 249-1  
2720-413 Amadora, Portugal

## Marcas registradas y patentes

Consulte la página <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

## Copyright

©2015 Roche Molecular Systems, Inc.

07340761001-02ES

Doc. Rev. 1.0

63

FATT. ROBERTA MELE MAZZA  
PRODUTTORE SINGHE S.A.S. DI  
DIVISIONE DIAGNOSTICA  
S.P.A. - DIREZIONE TECNICA

## Bibliografía

1. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:169-181.
2. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:760-774.
3. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, 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;12:735-742.
4. Paz-Ares L, Soulières D, Melezínek I, et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med*. 2010;14:51-69.
5. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures, 2012*. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2012>.
6. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
7. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990; 93:125-128.
8. Chosewood LC, Wilson DE. *Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition*. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009;21-1112.
9. 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.
10. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition*. 2011.
11. Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Yeap BY, Halmos B, Kim JH, Jänne PA, Huberman MS, Pao W, Tenen DG, Kobayashi S. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7060-7067.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition*. CLSI Document EP17-A2E: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition*. CLSI Document EP7-A2E Appendix D:Wayne, PA; CLSI, 2005.
14. Tarceva® (erlotinib) Package Insert.
15. Rosell, R., 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. *The Lancet Oncology*. 2012;13 v3:239-246.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved Guideline*. CLSI Document EP06-AE: Wayne, PA; CLSI, Apr 2003.

7817



APARTADO B: Para uso con muestras de plasma

cobas® EGFR Mutation Test v2

### Revisión del documento

Información de revisión del documento	
Doc Rev. 1.0 08/2015	Primera publicación.

E

7

Firm. ROBERTA ASELE MANZA  
PRODUCTOS ROCHE S.A. de C.V.  
DIVISION DIAGNOSTICA  
CC - DIRECTORA TÉCNICA





Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A.N. M. A.T

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE  
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-50/17-7

Se autoriza a la firma PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) a importar y comercializar lo Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado **EGFR Mutation Test v2** / ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ADN obtenido de tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina o de plasma de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. También como ayuda para elección de tratamiento. La prueba para uso con plasma también permite la medición semicuantitativa de las mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen EGFR a partir de recogidas en serie de plasma humano como ayuda en la gestión de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. En Envases conteniendo cantidad suficiente para 24 determinaciones. Vida útil: DIECIOCHO (18) meses; Condiciones de almacenamiento 2°C a 8°C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley Nº 16.463 y Resolución Ministerial Nº 145/98. Lugar de elaboración: ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, Inc. 1080 US Highway 202 South Branchburg, NJ 08876, Estados Unidos de America; *para*: ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim, Alemania. En las etiquetas de los envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

Σ

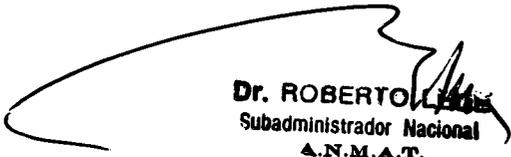
✓ ↗

MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado n°  
**008573**

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA  
MEDICA

Buenos Aires,

17 JUL. 2017

  
  
**Dr. ROBERTO LINARES**  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.  
Firma y sello