

Anbefaling for detektion af KRAS, NRAS og BRAF mutationer ved kolorektale karcinomer.

Version 3 (November 2016).

Udarbejdet af: Anbefalingerne er udarbejdet som samarbejde mellem Dansk Molekylær Patologi Gruppe (DMPG) og Udvalg for Molekylær Patologi (UMP) under Dansk Patologiselskab (DPAS).

Baggrund/targeteret behandling

Targeteret behandling af kolorektale karcinomer med Vectibix (Panitumumab) og Erbitux (Cetuximab) forudsætter mutationsundersøgelse af KRAS (exon 2, 3 og 4: codon 12, 13, 59, 61, 117 og 146) og NRAS (exon 2, 3 og 4: codon 12, 13, 59, 61, 117 og 146), da kun patienter med vildtype sekvens må behandles med disse medikamenter. Dels er behandlingen uden virkning ved KRAS/NRAS mutation, og dels er toxiciteten øget.

Endvidere skal BRAF codon Val600 undersøges for mutation. Muteret BRAF codon Val600 er markør for dårlig prognose uafhængigt af behandling. Effekten af anti-EGFR behandling ved BRAF Val600Glu mutation er beskeden med median ca. 1 måneds længere progressionsfri overlevelse. BRAF mutation er ikke associeret til øget toxicitet. (Ref. 1,2,3,6,7,8)

Udvælgelse af analysmateriale.

Ved udvælgelse af tumorvæv fra formalinfikseret paraffinindstøbt vævsmateriale vurderes materialet histologisk mht. andelen af tumorcellekerner i forhold til andre cellekerner (nekrotiske områder tælles ikke med). Vurdering af tumorcellefraktionen i vævsnit er vanskeligt reproducerbar, og forbundet med betragtelig usikkerhed. Et skøn er dog anvendeligt i forhold til vurdering af mutationsundersøgelsens repræsentativitet.

Der angives et skøn over procentandelen af tumorcellekerner i forhold til totalt antal cellekerner. Vurderingen foretages på et snit udtaget i umiddelbar relation til snittene til den molekylærbiologiske analyse, hvilket er særligt vigtigt ved anvendelse af biopsimateriale.

Hvis procentdelen af tumorvæv er insufficient i hele snit, selekteres et område til manuel mikrodisektion, hvor andelen af tumorcellekerner i det afskrabede område skal vurderes. Manuel mikrodisektion foretages ved markering af det egnede område og afskrabning af dette område fra ufarvede snit monteret på glas eller direkte fra paraffinblokken. Der kan anvendes materiale fra såvel primærtumor som fra en eller flere metastaser.

Mikrodisektion bør også overvejes i situationer, hvor der i vævssnittet er repræsentation af såvel adenom som karcinom, idet der kan være tale om kollision mellem to tumorer med forskellig RAS/RAF status.

Endvidere kan cytologisk materiale anvendes, hvor procenten af tumorcellekerner vurderes inden afskrabning af cellerne.

Analysemetoder.

Alle analysemetoderne indebærer oprensning af DNA, der PCR amplificeres og efterfølgende analyseres. Den sufficente tumorcellekerneprocent er vigtig for valg af optimal analysemetode. For at arbejde med en god sikkerhedsmargin skal tumorcellekerneholdet i det mikrodisekerede materiale ved PCR-analyserne være over analysens detektionsgrænse. Detektionsgrænsen ved real-

time PCR-analyse og Next Generation Sequencing er typisk 1-5 % tumorcellekerneindhold, ved pyrosekventering 10 % eller derover og ved Sangersekventering 30 % eller derover. Prøver, der har for lille andel af tumorprocent i forhold til den anvendte metode, kan svares ud ved påvist mutation, ellers må den erklæres uegnet. Den valgte analysemetode skal være valideret, og der skal medtages de for analysen relevante positive og negative kontroller.

Eksempel på analysemetoder, følsomhed, fordele og ulemper af dem:

Sangersekventering (30-50 % tumorcellekerner) (in-house metode).

Fordel: Finder alle mutationer.

Ulempe: Lav følsomhed og arbejdstungt. Kræver høj tumorcelleprocent.

Pyrosekventering (10 % tumorcellekerner) (in-house metode).

Fordel: Kan finde alle mutationer.

Ulempe: Relative arbejdstungt. Validering af metode.

Pyrosekventering (10 % tumorcellekerner) (kommercielt kit – se Appendiks A).

Fordel: Enkel opsætning. Valideret kit.

Ulempe: Finder kun udvalgte mutationer defineret af kittet.

Real-time qPCR (ca. 1-5 % tumorcellekerner) (in-house metode).

Fordel: Hurtig metode. Høj følsomhed.

Ulempe: Finder kun udvalgte mutationer defineret af primere og probe. Validering.

Real-time qPCR (ca. 1-5 % tumorcellekerner) (kommercielt kit – se Appendiks B).

Fordel: Hurtig metode. Høj følsomhed. Valideret kit.

Ulempe: Finder kun udvalgte mutationer defineret af kittet.

Idylla tests (5 % tumorcellekerner) (kommercielt kit – se Appendix C)

Fordel: Resultat indenfor 3 timer. Nem og enkel aflæsning. Valideret kit.

Ulempe: Alt materiale bruges i analysen. Finder kun udvalgte mutationer defineret af kittet. Der skal bruges tre kits til at samlet analyse af de tre gener.

Next Generation Sequencing (NGS) (ca. 1-5 % tumorcellekerner).

Fordel: Høj følsomhed. Finder alle mutationer. Cancer paneler indeholder alle relevante gener.

Ulempe: Arbejdstungt, efterfølgende dataanalyse som er mere kompliceret og kræver en molekylærbiolog/bioinformatiker til fortolkning.

Der findes yderligere kits til mutationsanalyser. Disse kits er ikke medtaget.

Bemærkninger.

Metoden til oprensning af DNA skal være valideret, og kvaliteten af det oprensede skal være i en kvalitet og mængde passende til den anvendte analysemetode.

Svarafgivelse bør indeholde. (Ref. 4)

1. Titel på analysen
2. Prøvedato (dd.mm.åå)
3. Prøvenummer
4. Rekvirent
5. Indikation for analysen
6. Prøvemateriale

7. Procent andel af tumorcellekerner i materialet
8. Anvendt metode og følsomhed af denne
9. Oplysning om mutationer der kan detekteres ved den anvendte metode
10. Genotype der er fundet ved analysen (anvendelse af korrekt nomenklatur)
11. Fortolkning af resultatet
12. Svardato
13. Signatur
14. Unik ID på hver side
15. Angivelse af totalt antal sider
16. Kodning med SNOMED koder (Appendiks D)

Svartiden for analysen bør være afstemt med klinikerne for videre planlægning af behandling.

Kvalitetskontrol.

Laboratoriet bør indgå i et eksternt kvalitetssikringsprogram, hvor hele arbejdsgangen fra DNA oprensning til svarafgivelse indgår (Ref. 9).

Eksempel:

<http://kras.eqascheme.org/>

<http://www.ukneqas-molgen.org.uk/ukneqas/index/news.html>

Appendiks A (Eksempler på Pyrosekventerings kits)

KRAS og NRAS:

* **Therascreen KRAS Pyro Kit** (p.Gly12Ala, p.Gly12Cys, p.Gly12Val, p.Gly12Arg, p.Gly12Ser, p.Gly12Asp, p.Gly13Asp, p.Gln61His, p.Gln61Leu, p.Gln61Arg, p.Gln61Lys, p.Gln61Glu) (Qiagen).

***Therascreen NRAS Pyro Kit** (p.Gly12Ala, p.Gly12Cys, p.Gly12Val, p.Gly12Arg, p.Gly12Ser, p.Gly12Asp, p.Gly12Phe, p.Gly12Asn, p.Gly12Trp, p.Gly13Asp, p.Gly13Cys, p.Gly13Glu, p.Gly13Arg, p.Gly13Val, p.Gln61His, p.Gln61Leu, p.Gln61Arg, p.Gln61Lys, p.Gln61Glu) (Qiagen).

***RAS Extension Pyro Kit** (KRAS: p.Ala59Thr, p.Ala59Gly, p.Lys117Asn, p.Ala146Val, p.Ala146Thr, p.Ala146Pro og NRAS: p.Ala59Thr, p.Ala59Gly, p.Lys117Asn, p.Ala146Val, p.Ala146Thr, p.Ala146Pro) (Qiagen).

*: De tre kits skal alle anvendes som samlet undersøgelse.

BRAF:

Therascreen BRAF Pyro Kit (p.Val600Glu, p.Val600Ala, p.Val600Gly, p.Val600Met, p.Gly464Glu, p.Gly464Val, p.Gly466Glu, p.Gly466Val, p.Gly469Ala, p.Gly469Glu, p.Gly469Val) (Qiagen).

Appendiks B (Eksempler på real-time PCR kits).

KRAS:

cobas KRAS Mutation Test (codons 12, 13, 61)(Roche).

LightMix Kit (NRAS 12, 13, 59, 61, 117, 146 and KRAS 117, 146) (Roche).

#: De to kits skal anvendes som samlet undersøgelse.

BRAF:

Therascreen BRAF RGQ PCR Kit (p.Val600Glu, p.Val600Asp, p.Val600Lys, p.Val600Arg, p.Val600Glu complex) (Qiagen).

cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (p.Val600Glu, p.Val600Asp, p.Val600Lys, p.Val600Glu complex) (Roche).

Appendiks C (Idylla kits).

Idylla KRAS Mutation test (p.Gly12Cys, p.Gly12Arg, p.Gly12Ser, p.Gly12Ala, p.Gly12Asp, p.Gly12Val, p.Gly13Asp, p.Ala59Glu, p.Ala59Thr, p.Ala59Gly, p.Gln61Lys, p.Gln61Leu, p.Gln61Arg, p.Gln61His, p.Lys117Asn, p.Ala146Val, p.Ala146Thr, p.Ala146Pro)

Idylla NRAS-BRAF-EGFR S492R Mutation Assay (NRAS: p.Gly12Cys, p.Gly12Ser, p.Gly12Asp, p.Gly12Ala, p.Gly12Val, p.Gly13Asp, p.Gly13Val, p.Gly13Arg, p.Ala59Thr, p.Gln61Lys, p.Gln61 Leu, p.Gln61Arg, p.Gln61His, p.Lys117Asn, p.Ala146Thr, p.Ala146Val; BRAF: p.Val600Glu, p.Val600Glu2, p.Val600Asp, p.Val600Lys, p.Val600Arg; EGFR: p.Ser492Arg)

Idylla BRAF Mutation test (p.Val600Glu, p.Val600Glu2, p.Val600Asp, p.Val600Lys, p.Val600Arg, p.Val600Met)

Appendiks D (SNOMED kodning) (Ref. 10)

T-kode (topografi kode)

M-kode (morfologi kode)

F-kode (funktion) – se liste nedenfor

P-kode (procedure)

SNOMED koder:

KRAS	NRAS	Snomed tekst
FE13D1	FE13Q1	Genstatus normal
FE13D3*	FE13Q3*	Gen muteret
FE13DA		p.Gly12Ala
FE13DB		p.Gly12Asp
FE13DC		p.Gly12Arg
FE13DD		p.Gly12Cys
FE13DE		p.Gly12Ser
FE13DF		p.Gly12Val
FE13DG		p.Gly13Asp
FE13DH	FE13QH	Genmutation codon 12
FE13DI	FE13QI	Genmutation codon 13
FE13DJ	FE13QJ	Genmutation codon 58
FE13DK	FE13QK	Genmutation codon 59
FE13DL	FE13QL	Genmutation codon 61
FE13DM	FE13QM	Genmutation codon 117
FE13DN	FE13QN	Genmutation codon 146
FE13D9	FE13Q9	Genændring uden kendt behandlingsekvens

BRAF:

FE13E1 BRAF genstatus normal

FE13E3* BRAF gen muteret

FE13EA BRAF genmutation p.Val600Glu

FE13EB BRAF genmutation p.Val600Lys

* : kan bruges med nærmere forklaring, hvor der ikke findes en specifik kode for den fundne mutation.

Revidering af anbefalingerne.

Anbefalingerne revideret november 2016 og revideres ved behov eller senest efter to år (2018).

Anbefalingerne er udarbejdet af:

Karin de Stricker, Rigshospitalet (Kontaktperson til UMP)

Steven Hamilton, Aarhus

Jesper Bonde, Hvidovre

Jens Ole Eriksen, Næstved

Lykke Grubach, Aalborg

Jan Lindebjerg, Vejle

Referencer.

1. Douillard et al (2013) Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 369;11:1023-1034.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024839>
2. Kirstein et al (2014): Targeted therapies in metastatic colorectal cancer: a systematic review and assessment of current available data. *The Oncologist* 19; p1-13.
<http://theoncologist.alphamedpress.org/content/early/2014/10/17/theoncologist.2014-0032.full.pdf+html>
3. Chan, E. (2016) Molecular Profiling of Colorectal Cancer. *My Cancer Genome*
<https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer>
4. Gulley ML et al. (2007) Clinical Laboratory Reports in Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*, Vol 131; p852-863. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550311>
5. Ogino S et al. (2007) Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnostics. *J. of Mol. Diagn.* vol 9, no 1; p1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251329>
6. EMA Panitumumab: Produkt information:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf
7. EMA Cetuximab: Produkt information:
http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf
8. De Roock et al. (2010) Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Vol 11; p. 753-762.*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619739>
9. van Krieken JH et al. (2013) Guideline on the requirements of external quality assessment programs in molecular pathology. *Virchows Arch.* 462; p27-37.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250354>
10. SNOMED kodning: <http://www.patobank.dk/>