

Svensk Förening för Patologi			
Mutationsanalys på tumörvävnad			Dok.nr
Framtagen av KVAST-gruppen i molekylärpatologi	Utgåva Remissutgåva 2012-03-20	Fastställt	Sida 1(7)

I. Innehållsförteckning

Klinisk bakgrundsinformation
Molekylärpatologiska kvalitetsparametrar
Kvalitetskontroll
Rekommendationer för utformning av svarstext
Kvalitetsindikatorer
SNOMED-koder
KVAST-gruppen i molekylärpatologi

II. Klinisk bakgrundsinformation

Klinisk molekylär patologi har fått en allt viktigare roll i rutindiagnostiken av solida tumörer. Den snabbt växande kunskapsmassan när det gäller molekulära förändringar i olika tumörentiteter gör att molekulärbiologisk diagnostik kan bidra med differentialdiagnostisk information. Dessutom finns ett snabbt växande utbud av riktade terapier inom cancervården. Dessa nya läkemedel, ofta antikroppar eller små molekyler riktade mot delar av tillväxtfaktorreceptorer eller signalmolekyler nedströms dessa, är dyra och har ofta bara effekt på tumören om vissa genetiska förändringar finns. I behandlingsindikationen ingår därför ofta kvalitetssäkrade behandlingsprediktiva molekylärpatologiska analyser. Samtidigt är analys av DNA från formalin-fixerat, paraffin-inbäddat (FFPE) material förknippat med ett flertal metodologiska utmaningar.

Under de senaste åren har antalet genetiska analyser på tumörvävnad ökat med exempel som FISH-analyser av *HER2*, mutationsundersökningar av *cKIT*, *PDGFRA* och nu senast även *KRAS*, *BRAF* samt *EGFR*. Samspelet mellan traditionell histopatologisk granskning och molekylärpatologisk analys är viktig och innebär en interaktion mellan en patolog som gör urval av representativ vävnad för den aktuella frågeställningen och en molekulärgenetiker som utför analysen på extraherat DNA. Eftersom resultaten ofta behöver tolkas gemensamt av de specialiserade yrkeskategorierna i form av en sammanvägd medicinsk/diagnostisk och molekulärbiologisk/teknisk bedömning så krävs en samlokalisering av kompetensen. Ett rationellt urval av material, val av metod för analys samt tolkning av analysresultaten förutsätter en integration av medicinskt, histologiskt/cytologiskt, tumörbiologiskt och molekulärgenetiskt kunnande. Samarbeten mellan olika organisationer kan fungera väl men patologin måste vara drivande och garantera att all behövlig kompetens finns representerad i organisationen. Föreliggande dokument ger rekommendationer för mutationsanalyser av solida tumörer och är baserad på publicerad litteratur, rekommendationer från European Society of Pathology och Association for Molecular Pathology (U.S.A.), samt erfarenheter från nätverket Svensk molekylär patologi (SMP).

III. Molekylärpatologiska kvalitetsparametrar

Kompetens

Det är av stor vikt att kompetens inom molekylär patologi finns genom hela analyskedjan. Både laboratoriepersonal och patologer måste utifrån sina roller i analysprocessen, både tekniskt och medicinskt, ha relevanta kunskaper om den medicinska frågeställningen, den morfologiska basen för definition av relevant provmaterial, och molekylärbiologisk förståelse av analysmetoden.

Lokaler och arbetsrutiner

Rutiner skall finnas för att förhindra kontamination mellan prover av amplifierat DNA-material. Ett minimikrav är fysiskt separerade arbetsplatser för provhantering före och efter PCR-amplifiering. Dessutom bör utrustning för provhantering vara tydligt märkt på de olika arbetsplatserna.

Vävnadsprocessning

Fixering: Rekommendationer gällande optimal fixering för morfologisk och immunhistokemisk diagnostik kan också tillämpas beträffande molekylärbiologiska analyser. Buffrad formalinlösning måste användas då surt pH är skadligt för DNA. För att undvika underfixering måste mängden formalinlösning vara minst 10x större än den vävnad som ska fixeras. Optimal fixering anges oftast till mellan 24-48 h, men erfarenheter visat att betydligt längre fixeringstider är förenliga med adekvat analys.

Urkalkning: Många laboratorier internationellt avvisar helt urkalkade prover då protokollen innebär behandling med syror som förstör DNA. Andra laboratorier beskriver acceptabla resultat med korta urkalkningsprogram eller EDTA-baserade protokoll. Ej urkalkat tumörmaterial bör användas för molekylärpatologisk diagnostik. Om urkalkat material används bör kontroll av amplifierbarhet och sekvenserbarhet ingå i analysen av det aktuella provet och beskrivas i svaret.

Cytologiskt material: Många publikationer beskriver goda resultat vid mutationsanalys på cytologiskt material. Det saknas enhetliga rekommendationer beträffande cellprocessningen inför molekylära analyser så man behöver lokalt säkerställa att adekvat DNA-kvalitet bibehålls.

Utskärning

Vi rekommenderar att man vid utskärning av en tumör, oberoende av tumörtyp och organ, bäddar minst en "liten"/normal kloss med representativ tumörvävnad med hög tumörcellshalt. Storsnitt är klumpiga att hantera och kräver nästan alltid manuell mikrodissektion för att uppnå adekvat tumörcellshalt.

Tumörcellshalt

Tumörcellshalten i den vävnad som används för DNA-extraktion är av avgörande betydelse för att en mutation ska kunna påvisas. Detektion av en förvärvad mutation i tumörceller försvåras alltid av en varierande grad av utspädning med omuterat DNA från genetiskt normala celler i och omkring tumören – fibroblaster, endotelceller, inflammatoriska celler, benignt parenkym etc. I ett analyserat vävnadsprov måste fraktionen av viabla tumörceller vara tillräckligt hög i förhållande till sensitiviteten hos den analysplattform som används. Den nödvändiga tumörcellshalten kan variera mellan 5-40 % beroende på analysmetod.

Tumörcellhalten ska beräknas på basen av intakta tumörcellskärnor i viabla tumörceller) i förhållande till antalet viabla genetiskt normala kärnförande celler. Nekrotiska områden ska undvikas. Ett fel som ofta begås är att beräkna tumöryta istället för cellantal vilket ofta leder

till en överskattning av tumörcellsfraktionen och kan leda till misstolkningar av analysresultaten. Bedömningen av tumörcellshalten skall göras på ett rutinfärgat snitt, helst det senaste snittet från klossen, eftersom de efterföljande ska användas för DNA-extraktion. Bedömning av tumörcellshalt och ställningstagande till tumörcellsanrikning bör göras av den patolog som är ansvarig för analysen och signerar ut provsvaret. För cytologiskt material måste värderingen av tumörcellshalten anpassas efter typen av material – utstryksglas, vätskebaserad cytologi, cellblock.

Tumörcellsanrikning

För att uppnå adekvat tumörcellshalt behöver man ibland selektera vävnad från en del av en kloss/snitt. Det finns flera lämpliga tekniker och vi beskriver här de valigast använda. Vid manuell mikrodisektion markeras områden med hög tumörcellshalt på ett närliggande rutinfärgat snitt från den aktuella klossen. Ofärgade snitt förs sedan över på objektglas och med vägledning av markeringarna på det rutinfärgade glaset så separeras delarna med hög tumörcellshalt med hjälp av steril skalpell eller kanyl. Ett alternativ är att stansa ut tumörmaterial direkt ur representativt tumörområde i klossen. Om det rör minimala biopsifragment är det ibland nödvändigt att skära ut/skrapa ur materialet direkt från klossen. I utlåtandet skall man ange om tumörcellsanrikning har skett, och vilken teknik som använts. Om separationen innebär signifikanta osäkerheter ska detta också framgå av utlåtandet.

Tumörheterogenitet

För de flesta mutationsanalyser är det fortfarande oklart vilka delar av en tumör som bör användas för mutationsanalys. Är det exempelvis möjligt att, vid brist på material, använda perifera delar, t.ex. adenomatösa formationer i en coloncancer, i stället för tydligt invasiva komponenter? Även för centrala tumörändelar kan en tumörheterogenitet inte uteslutas. Detta bör beaktas för varje mutation och organtyp. Eventuella osäkerheter ska rapporteras i utlåtandet. Liknande oklarhet består för skillnader av mutationsstatus mellan primärtumör och metastas eller recidiv. Oklarheter beträffande analyserad tumörkomponent (t.ex. när den dominerande invasiva komponenten för aktuellt PAD inte analyserats), ska framgå av utlåtandet.

Snittning

Rutiner behöver etableras för att minimera risken för kontamination mellan patientfall vid snittning. Om flera klossar snittas efter varandra för DNA-preparation behöver arbetsredskap och ytor rengöras mellan varje fall. Engångsknivar rekommenderas med byte av blad mellan varje fall.

DNA-extraktion

Extraktion av DNA måste göras med en väl validerad metod. Hittills finns inga anledningar att föredra en tillverkares produkt framför någon annans.

Skickeprover

När material skickas från externt patologlaboratorium bör en lokal patolog välja ut representativ tumörkloss för analys. I första hand skickas klossen tillsammans med remiss med uppgift om frågeställning och önskad analys tillsammans med svarskopia på aktuellt PAD. I andra hand kan ofärgade snitt skickas efter lokala överenskommelser.

IV. Kvalitetskontroll

Validering

Varje moment i analyskedjan från urval av material och DNA-extraktion till mutationsanalys, ska valideras för att säkerställa kvaliteten.

Vid validering av DNA-extraktion bör både kvalitet och kvantitet uppskattas. För detta finns olika metoder tillgängliga såsom absorbans- eller fluorescensmätning. För DNA extraherat från formalinfixerad paraffinbäddad vävnad är det relevant att mäta graden av DNA-degradering. Detta kan göras med en multiplex PCR där ampliconen har olika storlek (exempelvis 100, 200, 300, 400 och 500 bp).

Valideringen av mutationsanalysen skiljer sig åt beroende på vilken typ av analys man har valt. Generellt sett gäller att valideringskraven är högst om det gäller analyser med behandlingsprediktiv inriktning exempelvis BRAF vid maligna melanom eller EGFR vid NSCLC.

Behovet av lokal validering beror också på om man utnyttjar egenutvecklade analyser ("in-house") eller externt validerade kommersiellt tillgängliga analyser och analysplattformar. Vid "in-house" analyser ställs internationellt valideringskraven mycket högt och det bör även gälla svenska förhållanden.

Vid validering av en "in-house"-metod skall först en teknisk validering göras där specificiteten av primers kontrolleras bioinformatiskt och ampliconet verifieras med sekvensering. Därefter skall metodens analytiska och kliniska sensitivitet uppskattas. Detta kräver att laboratoriet har tillgång till säkra positiva och negativa kontroller. Kontrollerna bör innehålla relevanta kända mutationer och vildtyps-DNA samt vara extraherade från samma typ av vävnad som testet är tänkt att användas på. Utvärdering enbart på DNA från cellinjer eller syntetiska DNA-konstrukt betraktas inte som optimalt. Sensitiviteten bestäms genom analys av kända mutationer i olika spädningar för att uppskatta tröskelvärdet för tumörcellhalten, d.v.s den lägsta tumörcellshalt som fortfarande resulterar i säker detektion av aktuell mutation. Övriga parametrar som kan behöva granskas i detta sammanhang är reproducerbarhet, "limit of detection", range och känslighet för störande substanser.

Vid val av analysplattformar och reagens finns även kommersiella lösningar med hög valideringsgrad att tillgå. Dessa kan vara CE-märkta eller FDA godkända och validerade för att kunna användas för klinisk diagnostik (IVD). Även omlaboratoriet väljer att använda sig av dylika "förvaliderade" kits måste en begränsad lokal validering som brukar betecknas verifikation utföras. Vid en sådan verifikation räcker det om laboratoriet visar att testen håller de specifikationer det utger sig för och att det fungerar i laboratoriets egna rutiner. Vid denna begränsade verifikation bör åtminstone uppgiven analytisk sensitivitet, repeterbarheten och en rimlig relevant panel av positiva och negativa kontroller testas.

Omfattningen på materialet som används för validering är olika för olika mutationsanalyser och vävnadstyper samt beror på det enskilda laboratoriets erfarenheter. För att konfirmera testresultatet bör valideringsmaterialet (framförallt när det gäller "in-house"-metoder, om det är möjligt, analyseras med en alternativ metod eller på ett annat laboratorium. Valideringen bör dokumenteras och resultaten godkännas gemensamt av de tekniskt och medicinskt ansvariga innan den tas i bruk.

Kontroller

Vid varje analystillfälle skall en positiv (intern eller extern) kontroll finnas för att säkerställa att amplifieringen och/eller detektionssteget fungerar. Vidare skall en negativ kontroll (vatten istället för DNA) användas för att kunna detektera eventuell kontamination. Beroende på vilken analysplattform som används bör också mutationsspecifika positiva kontroller inkluderas.

Löpande kvalitetskontroll

Resultaten skall utvärderas statistiskt minst en gång per år för att identifiera för höga eller för låga mutationsfrekvenser samt förekomst av okända eller sällsynta mutationer. Resultaten skall även jämföras med andra laboratorier inom SMP-gruppen och aktuella publikationer. Deltagande i externa kontrollprogram bör ske minst vart tredje år eller vid metodbyte alternativt avvikande resultat.

V. Rekommendationer för utformning av svarstext

Följande parametrar bör ingå i svarstexten, anpassat från European Society of Pathology:

1. Identifiering av patienten
2. Identifiering av materialet (Lab-ID, inklusive klossnummer)
3. Provtyp (cytologi, biopsi, operationspreparat), fixeringsmetod (färsk, fryst, FFPE).
 4. Eventuell typ av tumörcellsseparation (manuell mikrodisektion etc)
 5. Tumörcellshalt (0-100 %). Bedömning om tumörcellshalten gör att provet lämpar sig för analys.
6. Testmetod inklusive DNA extraktionsmetod och testade genetiska förändringar
7. Testresultat och eventuella tolkningsproblem.
8. Värdering av fyndens betydelse i förhållande till klinisk frågeställning.

Genetiska förändringar anges enligt www.hgvs.org (tex c.35G>A, p. Gly12Ala)

Exempel

Patient NN, yymmdd-nnnn

Vävnadens provnummer:

PAD Linköping 222-11, kloss 1A

Provtyp:

Paraffinbäddad vävnad, operationspreparat. Ev tumörcells anrikning, teknik.

MIKROSKOPI:

Mikroskopi analys av provet uppvisar 60 % tumörceller inom det manuellt mikrodisekerade området. Provet är lämpligt för KRAS analys.

MUTATIONSANALYS:

Mutation påvisas i kodon 12 i KRAS-genen: p.Gly12Arg (c.34G>C)

Använd metod: DNA-extraktion med Qiagen QIAamp® DNA FFPE-kit, KRAS mutations analys med TheraScreen® KRAS Mutation Kit (CE-IVD) (Qiagen), som detekterar de vanligaste rapporterade KRAS mutationerna. Mutationer som screenas: p.Gly12Asp (c.35G>A), p.Gly12Ala (c.35G>C), p.Gly12Val (c.35C>T), p.Gly12Ser (c.34G>A), p.Gly12Arg (c.34G>C), p.Gly12Cys (c.34G>T), p.Gly13Asp (c.38G>A). Dessa mutationer representerar 98% av KRAS mutationerna bland kolorektal cancer. Therascreen metoden har hög sensitivitet. Om tillräckligt DNA föreligger kan 1% muterat DNA detekteras mot en vildtyps bakgrund.

Värdering:

Analysresultatet talar emot behandlingssvar vid terapi med anti-EGFR-antikroppar.

DIAGNOS:

Molekylärpatologisk undersökning: Tumörvävnad med påvisad mutation i KRAS genen.

VI. Kvalitetsindikatorer

- För varje typ av mutationsanalys/klinisk frågeställning: Antal konklusivt besvarade fall / antal besvarade fall med angiven osäkerhet/ antal fall som ej kunde analyseras eller besvaras all med avseende på frågeställningen/ totalt antal remisser. Dessa variabler påverkas av typ och mängd inskickat material. Många inkonklusiva analyser bör föranleda utredning – är biopsimaterialet för sparsamt?, vävnadsprocessningen ej optimal?, utredningsalgoritmerna ej är optimala?, analysplattformens prestanda ej optimal?, felaktiga laboratorieprocesser? etc...
- Dokumentation om mutationsfrekvens i förhållande till förväntad frekvens från litteratur / databaser / andra laboratorier inom Svensk Molekylär Patologi (SMP). Denna variabel måste tolkas med försiktighet. Antalet positiva fall kan variera mellan laboratorier beroende på att indikationerna för mutationstestning inte är likformiga över landet – lokalt och regionalt används olika urvalskriterier för att bestämma vilka patientfall som ska analyseras.

VII. SNOMED kodning

Internationella SNOMED koder för molekylär patologi saknas. M-kodning bör ske enligt nedan vilket är i enlighet med den Danska Sundhetsstyrelsens officiella SNOMED klassifikation (<http://www.patobank.dk>). Denna kodning är omfattande men underlättar kvalitetsuppföljningen.

FE13C1	EGFR genstatus normal
FE13C3	EGFR gen muterad
FE13C5	EGFR genamplifikation
FE13CA	EGFR genmutation L858R
FE13CB	EGFR genmutation L861Q
FE13CC	EGFR genmutation G719X
FE13CD	EGFR genmutation S768I
FE13CK	EGFR gendeletion exon 19
FE13CP	EGFR geninsertion exon 20

FE13D1	KRAS genstatus normal
FE13D3	KRAS gen muterad
FE13DA	KRAS genmutation Gly12Ala
FE13DB	KRAS genmutation Gly12Asp
FE13DC	KRAS genmutation Gly12Arg
FE13DD	KRAS genmutation Gly12Cys
FE13DE	KRAS genmutation Gly12Ser
FE13DF	KRAS genmutation Gly12Val
FE13DG	KRAS genmutation Gly13Asp

FE13E1	BRAF genstatus normal
--------	-----------------------

FE13E3	BRAF gen muterad
FE13EA	BRAF genmutation V600E
FE13EB	BRAF genmutation V600K

FE13G1	C-KIT genstatus normal
FE13G2	C-KIT geninsertion
FE13G3	C-KIT gen muterad
FE13G4	C-KIT gendeletion
FE13GA	C-KIT exon 9 abnorm
FE13GB	C-KIT exon 11 abnorm
FE13GC	C-KIT exon 13 abnorm
FE13GD	C-KIT exon 17 abnorm
FE13H1	PDGFRa genstatus normal
FE13H2	PDGFRa geninsertion
FE13H3	PDGFRa gen muterad
FE13H4	PDGFRa gendeletion
FE13HA	PDGFRa exon 12 muterad
FE13HB	PDGFRa exon 18 muterad

FE13J1	JAK2 genstatus normal
FE13JA	JAK2 genmutation V617F
FE13JB	JAK2 genmutation exon 12
FE13K1	NPM1 genstatus normal
FE13K3	NPM1 gen muterad
FE13L1	FLT3 genstatus normal
FE13LA	FLT3 genmutation D835/I836
FE13LB	FLT3 genmutation ITD
FE13M1	CEBPa genstatus normal
FE13M3	CEBPa gen muterad
FE13N7	IgHV gen hypermuterad
FE13N8	IgHV gen icke hypermuterad

VIII. KVAST-gruppen i molekylärpatologi

Johan Botling, Uppsala (Sammankallande)

Partick Micke, Uppsala

Fredrik Enlund, Göteborg

Martin Hallbeck, Linköping

Anders Edsjö, Skåne

Rickard Palmqvist, Umeå

Göran Elmberger, Stockholm

Mehran Ghaderi, Stockholm

Gisela Helenius, Örebro