

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

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**

På baggrund af de nye muligheder for targeteret behandling af kolorektale karcinomer med Vectibix (anti-EGFr; Panitumumab) er det ikke længere tilstrækkeligt at undersøge KRAS (codon 12 og 13 i exon 2) som hidtil. Der er behov for at kunne undersøge 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 Vectibix (Panitumumab) (se referencer).

Endvidere skal BRAF codon V600 undersøges for mutation. Muteret BRAF codon V600 er markør for dårlig prognose uafhængigt af behandling, men muteret BRAF er ikke prædiktiv for effekten af Vectibix (Panitumumab).

### **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). Der angives en procent tumorcellekerner af 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.

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 anbefales tumorcellekerneindholdet i det mikrodisekerede materiale ved PCR-analyserne at 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.

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 tumorcelle procent.

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.

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

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

Ulempe: Dyrt. Tager tid og er endnu ikke så udbredt.

### **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.**

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 C)

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

### **Kvalitetskontrol.**

Laboratoriet bør indgå i eksternt kvalitetssikringsprogram.

Eksempel:

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

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

### **Revidering af anbefalingerne.**

Anbefalingerne revideres ved behov – dog senest efter to år.

### **Anbefalingerne er udarbejdet af:**

Karin de Stricker, Odense (Kontaktperson til UMP)

Estrid Høgdall, Herlev

Steven Hamilton, Aarhus

Jesper Bonde, Hvidovre

Delfina Fornari, Hvidovre

Ditte Møller Ejegod, Hvidovre

Morten Grauslund, Rigshospitalet

Jens Ole Eriksen, Næstved

Dorte Linnemann, Herlev

Rikke Fredslund Andersen, 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. 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>
3. 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>
4. EMA Panitumumab: Produkt information:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Assessment\\_Report\\_-\\_Variation/human/000741/WC500148667.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000741/WC500148667.pdf)
5. EMA Cetuximab: Produkt information:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf)
6. 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>
7. 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>

## **Appendiks A (Eksempler på Pyrosekventerings kits)**

### **KRAS og NRAS:**

\* **Therascreen KRAS Pyro Kit** (G12A, G12C, G12V, G12R, G12S, G12D, G13D, Q61H, Q61L, Q61R, Q61K, Q61E) (Qiagen).

\***Therascreen NRAS Pyro Kit** (G12A, G12C, G12V, G12R, G12S, G12D, G12F, G12N, G12W, G13D, G13C, G13E, G13R, G13V, Q61H, Q61L, Q61R, Q61K, Q61E) (Qiagen).

\***RAS Extension Pyro Kit** (KRAS: A59T, A59G, K117N, A146V, A146T, A146P og NRAS: A59T, A59G, K117N, A146V, A146T, A146P) (Qiagen).

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

### **BRAF:**

**Therascreen BRAF Pyro Kit** (V600E, V600A, V600G, V600M, G464E, G464V, G466E, G466V, G469A, G469E, G469V) (Qiagen).

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

### **KRAS:**

§**Therascreen KRAS RGQ PCR Kit** (G12A, G12C, G12V, G12R, G12S, G12D, G13D) (Qiagen).

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

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

§:Der findes ikke real-time kits til de øvrige mutationer i KRAS og NRAS fra Qiagen.

#:De to kits skal anvendes som samlet undersøgelse.

### **BRAF:**

**Therascreen BRAF RGQ PCR Kit** (V600E, V600D, V600K, V600R, V600E complex) (Qiagen).

**cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test** (V600E, V600D, V600K og, V600E2) (Roche).

### **Appendiks C (SNOMED kodning)**

T-kode (topografi kode)

M-kode (morfologi kode)

F-kode (funktion) – se liste nedenfor

P-kode (procedure)

SNOMED koder:

FE13D1	KRAS genstatus normal
FE13D3 <sup>⌘</sup>	KRAS gen muteret
FE13DG	KRAS genmutation Gly13Asp
FE13DA	KRAS genmutation Gly12Ala
FE13DB	KRAS genmutation Gly12Asp
FE13DC	KRAS genmutation Gly12Arg
FE13DD	KRAS genmutation Gly12Cys
FE13DE	KRAS genmutation Gly12Ser
FE13DF	KRAS genmutation Gly12Val
FE13Q1	NRAS genstatus normal
FE13Q3 <sup>⌘</sup>	NRAS gen muteret
FE13E1	BRAF genstatus normal
FE13E3 <sup>⌘</sup>	BRAF gen muteret
FE13EA	BRAF genmutation V600E
FE13EB	BRAF genmutation V600K

<sup>⌘</sup>: kan bruges med nærmere forklaring, hvor der ikke findes en specifik kode for den fundne mutation.