

Zalecenia metodyczne dotyczące oceny mutacji genu EGFR oraz rearanżacji genu ALK w kwalifikacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do terapii ukierunkowanych molekularnie



Rekomendacje Grupy Roboczej:
Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
Polskie Towarzystwo Chorób Płuc
Polskie Towarzystwo Onkologiczne
Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
Polskie Towarzystwo Patologów
Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka

Warszawa 2014

prof. dr hab. Paweł Krawczyk – Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polskie Towarzystwo Chorób Płuc
prof. dr hab. Joanna Chorostowska-Wynimko – Samodzielna Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Polskie Towarzystwo Chorób Płuc
prof. dr hab. Rafał Dziadziuszko – Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Polskie Towarzystwo Onkologiczne
prof. dr hab. Jacek Jassem – Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Polskie Towarzystwo Onkologiczne
prof. dr hab. Maciej Krzakowski – Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, Polskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
dr hab. Renata Langfort – Zakład Patomorfologii Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Polskie Towarzystwo Patologów
dr Elżbieta Puacz – Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
dr hab. Bartosz Wasąg – Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka
dr hab. Kamila Wojas-Krawczyk – Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie

Badania molekularne mające na celu wykrycie mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* wykonuje się rutynowo w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca w celu właściwej kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanych molekularnie. Przedstawiamy polskie zalecenia metodyczne prowadzenia diagnostyki molekularnej nieprawidłowości w genach *EGFR* i *ALK*. Zalecenia te opisują szczegółowo wskazania kliniczne do wykonania testów, rodzaj materiału oraz sposób postępowania z nim, a także wymagania stawiane laboratoriom wykonującym diagnostykę molekularną.



Wprowadzenie

Wytyczne prezentują opinie polskich ekspertów dysponujących znaczącym doświadczeniem w zakresie diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Wraz z szybkim rozwojem ukierunkowanej molekularnie farmakoterapii chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca znacząco wzrasta w Polsce liczba diagnostycznych badań genetycznych wykonywanych celem prawidłowej kwalifikacji chorych do leczenia. Wytyczne mają na celu wnikliwie omówienie metodyczne wszystkich etapów właściwie prowadzonej diagnostyki. Z założenia mają umożliwić eliminację niewłaściwych praktyk laboratoryjnych, skutkujących błędnym wynikiem badania genetycznego lub opóźnieniem procesu diagnostycznego.

Według *obwieszczenia Ministra Zdrowia w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (1 marca 2014 roku)*, ukierunkowane molekularnie leczenie chorych na NDRP prowadzone w ramach programu lekowego obejmuje stosowanie dwóch inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT) EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), którymi są erlotynib i gefitynib [1]. Oba leki mogą być stosowane w 1. i 2. linii leczenia u chorych na niektóre podtypy morfologiczne NDRP w stadium miejscowego zaawansowania (chorzy poza możliwościami leczenia radykalnego) lub uogólnienia z obecnością mutacji aktywującej w genie *EGFR* [2]. W najbliższej przyszłości spodziewane jest poszerzenie możliwości leczenia ukierunkowanego molekularnie chorych na miejscowo zaawansowanego i uogólnionego NDRP o leki zarejestrowane w Unii Europejskiej, ale nie objęte dotąd systemem refundacji w Polsce. Należą do nich: nieodwracalny IKT EGFR, HER2 i HER4 – afatynib oraz inhibitor kinazy tyrozynowej ALK (ang. *anaplastic lymphoma kinase*) – kryzotynib.

1. Wskazania kliniczne do oceny mutacji w genie *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* u chorych na NDRP

A. Rekomendacja: Potwierdzenie obecności mutacji w genie *EGFR* lub rearanżacji genu *ALK* w komórkach nowotworowych jest kluczowym kryterium kwalifikacji chorych na NDRP do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem IKT EGFR lub IKT ALK [2].

B. Rekomendacja: Decyzję o wykonaniu badania genetycznego u chorego na NDRP powinien podjąć lekarz onkolog lub pulmonolog na podstawie indywidualnej oceny stanu chorego oraz wskazań klinicznych do leczenia ukierunkowanego molekularnie. Oznaczenie mutacji genu *EGFR* należy wykonać u chorych z rozpoznaniem NDRP o innym utkaniu niż płaskonabłonkowe, natomiast badanie rearanżacji genu *ALK* – u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego lub zawierającego komponent utkania gruczołowego. Stopień zróżnicowania histologicznego (ang. *grade*) nie ma wpływu na wskazania do diagnostyki molekularnej [3-8].

Nie zaleca się wykonania badania genetycznego, jeśli w ocenie histopatologicznej wycinków guza uwidoczniono jedynie komórki raka płaskonabłonkowego, raka drobnokomórkowego płuca lub rakowiaka. W sytuacji, gdy w oparciu o standardowe barwienie hematoksylina + eozyna (H+E) nie można określić podtypu NDRP, konieczne jest wykonanie barwień histochemicznych (na obecność śluzu w komórkach raka) i/lub immunohistochemicznych (IHC).

Wskazane jest oznaczenie ekspresji co najmniej dwóch markerów: TTF-1, którego obecność wskazuje na różnicowanie gruczołowe raka i p63 lub p40, którego ekspresja przemawia za różnicowaniem płaskonabłonkowym raka. W przypadku preparatów cytologicznych badanie IHC powinno każdorazowo poprzedzać kwalifikację do diagnostyki genetycznej [3-8].

UWAGA: Dopuszczalne jest wykonanie badania molekularnego w kierunku mutacji genu *EGFR*, jeśli ustalenie typu morfologicznego NDRP nie jest możliwe (ang. *not otherwise specified, NOS*) [5-8].

C. Rekomendacja: Kryteria demograficzne, takie jak płeć, rasa i wywiad w kierunku palenia tytoniu, nie mają wpływu na wskazania do poszukiwania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* u chorych na NDRP. Dopuszczalne jest uwzględnienie wywiadu odnośnie palenia tytoniu, jeśli diagnostyka prowadzona jest w oparciu o materiał tkankowy ubogokomórkowy lub materiał cytologiczny w którym nie wykluczono obecności komponentu gruczołowego (NDRP NOS) [6-8].

D. Rekomendacja: Materiał tkankowy pochodzący z guza pierwotnego i materiał tkankowy pochodzący z przerzutów NDRP należy traktować jako równoważnościowe dla oznaczenia mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*. Brak jest uzasadnienia dla równoczesnego badania kilku wycinków z jednego nowotworu [6-8].

2. Zasady prowadzenia diagnostyki molekularnej w kierunku mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*

A. Rekomendacja: Zaleca się, aby lekarz onkolog lub pulmonolog kierujący do oceny patomorfologicznej materiał chorego z podejrzeniem miejscowo zaawansowanego lub uogólnionego NDRP (stadium IIIB i IV wg siódmej edycji klasyfikacji TNM [9-10]) pisemnie zlecał kontynuowanie diagnostyki w zakresie badań genetycznych, o ile uzasadnia to rozpoznanie morfologiczne, objętość i jakość dostępnego materiału. W tym przypadku zaleca się, aby patomorfolog w momencie ustalenia rozpoznania mikroskopowego podejmował decyzję o ewentualnym kontynuowaniu diagnostyki genetycznej w kierunku mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*. W razie braku stosownego zalecenia lekarskiego, zabezpieczony materiał powinien być przekazany do badania genetycznego niezwłocznie po uzyskaniu pisemnego skierowania od lekarza prowadzącego [6-8].

Konieczne jest wykonanie badania genetycznego u chorych na mniej zaawansowane postaci niedrobnokomórkowego raka płuca w momencie nawrotu choroby lub w przypadku braku możliwości leczenia radykalnego, o ile rozważana jest kwalifikacja do leczenia ukierunkowanego molekularnie.

B. Rekomendacja: Zaleca się, aby w postępowaniu diagnostycznym w pierwszej kolejności dokonać oceny mutacji genu *EGFR*. Oznaczenie rearanżacji genu *ALK* u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego należy wykonać po uprzednim potwierdzeniu braku mutacji somatycznych w genie *EGFR*. Obecnie brak wystarczających dowodów klinicznych uzasadniających analizę innych markerów molekularnych u chorych na NDRP [6-8].

C. Rekomendacja: Czas oczekiwania na wynik oznaczenia mutacji genu *EGFR* i/lub rearanżacji genu *ALK* nie powinien przekraczać 10 dni roboczych od momentu dostarczenia materiału tkankowego do laboratorium genetycznego. Zaleca się jednak, aby czas oczekiwania na wynik badania genetycznego wynosił maksymalnie 5 dni roboczych [6-8].

D. Rekomendacja: Zaleca się aby laboratoria, w których czas oczekiwania na oznaczenie mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* przekracza 10 dni roboczych dostosowały swoje procedury i techniki badawcze do powyższych wymagań [6-8].

E. Rekomendacja: Czas przygotowania materiału archiwalnego przez pracownię patomorfologii i dostarczenia do laboratorium genetycznego nie powinien przekraczać 3 dni od momentu otrzymania skierowania. Akceptowalne jest wydłużenie okresu w razie konieczności ponownej oceny morfologicznej materiału [6-8].

3. Wymagania stawiane diagnostycznym laboratoriom genetycznym wykonującym badania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*

A. Rekomendacja: Zasady funkcjonowania laboratoriów wykonujących diagnostykę genetycznych czynników predykcyjnych dla terapii ukierunkowanych molekularnie w chorobach nowotworowych muszą być zgodne z zapisami Ustawy z dnia 27 lipca 2001 roku o Diagnostyce Laboratoryjnej (tekst jednolity Dz.U. z 2014 r. poz. 174) oraz Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r., zmieniającym rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2009 nr 22 poz. 128). Poniższe rekomendacje B-D uszczegółwiają zasady funkcjonowania laboratorium zawarte w Załączniku nr 3 do Rozporządzenia MZ.

B. Rekomendacja: Badanie genetyczne może być wykonywane wyłącznie pod nadzorem diagnosty laboratoryjnego lub lekarza, który jest zatrudniony w pracowni wykonującej to badanie oraz: 1) posiada tytuł specjalisty: dla diagnostów – laboratoryjna genetyka medyczna, dla lekarzy – genetyka kliniczna i jest zatrudniony nieprzerwanie w pracowni wykonującej badania genetyczne lub 2) posiada co najmniej dwuletni staż pracy w laboratorium genetycznym i jest w trakcie specjalizacji z laboratoryjnej genetyki medycznej lub 3) w ciągu ostatnich pięciu lat jest zatrudniony nieprzerwanie w laboratorium genetycznym prowadzącym badania mutacji w genie *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*.

C. Rekomendacja: Badanie mutacji w genie *EGFR* oraz rearanżacji genu *ALK* jest rutynową procedurą oceny niedziedzicznych nieprawidłowości genetycznych w komórkach nowotworowych. Nie jest więc konieczne uzyskanie odrębnej świadomej zgody pacjenta na wykonanie badania genetycznego. Ogólna zgoda na przeprowadzenie badań diagnostycznych, w tym badania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*, powinna być uzyskiwana przy przyjęciu do szpitala i przechowywana razem z całą dokumentacją chorego.

D. Rekomendacja: Zaleca się, aby laboratoria genetyczne, wykonujące diagnostykę mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*, prowadziły okresową wewnętrzną kontrolę jakości wykonywanych badań oraz uczestniczyły w programach zewnętrznej oceny jakości (ang. *external quality assessment*, EQA) [12]. Polskie laboratoria genetyczne mają dostęp do programów EQA prowadzonych przez uznane międzynarodowe ośrodki badania jakości w diagnostyce genetycznej (np. *European Molecular Quality Network*, *European Society of Pathology*) i powinny posiadać certyfikaty jakości wydane przynajmniej przez jeden z nich.

E. Rekomendacja: Zaleca się opracowanie polskiego programu zewnętrznej kontroli jakości obejmującego badanie mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* w materiale od chorych na NDRP.



4. Wymagania dotyczące technik oraz zakresu badania mutacji genu *EGFR*

A. Rekomendacja: Badanie genetyczne w kierunku mutacji genu *EGFR* powinno być wykonywane jedynie w materiale zabezpieczonym odpowiednimi technikami: 1) fragmentach tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (materiał preferowany ze względu na stabilność, przydatny do badania genetycznego nawet po kilku latach od pobrania materiału); 2) świeżo pobranych fragmentach tkanek; 3) tkankach zamrożonych; 4) tkankach utrwalonych w alkoholu. Materiały utrwalone w inny sposób, zwłaszcza z zastosowaniem utrwalaaczy zawierających związki metali ciężkich lub roztworów o właściwościach odwapniających i w środowisku kwaśnym, nie powinny być wykorzystywane do oceny mutacji genu *EGFR*. Zaleca się ściśle przestrzeganie czasu utrwalania tkanek w 10% zbuforowanym roztworze formaliny, który powinien wynosić 6-48 godzin. Każde odstępstwo od rutynowych procedur laboratoryjnych, zwłaszcza zalecanego czasu utrwalania oraz metodyki zatapiania tkanek w parafinie należy odnotować w raporcie patomorfologicznym, ze względu na ich ewentualny wpływ na integralność DNA komórek nowotworowych [5-8].

B. Rekomendacja: Materiał cytologiczny, zwłaszcza utrwalony w postaci cytobloków lub jako rozmaz na szkiełku podstawowym jest właściwy do analizy mutacji genu *EGFR*. Zawiesina komórek do sporządzenia cytobloku powinna być utrwalona w 10% zbuforowanym roztworze formaliny lub w 70% roztworze etanolu przez 6-48 godzin. Zaleca się, aby laboratorium przeprowadziło walidację pełnej procedury opracowania materiału cytologicznego, w tym jego utrwalania i analizy genetycznej w kierunku mutacji genu *EGFR* [5-8, 13-14].

C. Rekomendacja: Zaleca się, aby wybór reprezentatywnego materiału do oznaczenia mutacji genu *EGFR* był dokonywany przez patomorfologa. Konieczna jest ocena procentowej zawartości komórek nowotworowych i ognisk martwicy, a w przypadku preparatów cytologicznych – także liczby komórek nowotworowych. Wskazane jest przygotowanie seryjnie skrojonych preparatów z bloczków parafinowych lub cytobloków według następującego schematu:

1. preparat grubości 3 μm przeznaczony do oceny zawartości komórek nowotworowych w badanym materiale (barwienie hematoksyliną i eozyną, H+E);
2. preparat o grubości minimum 8-10 μm przeznaczony do izolacji DNA (w przypadku materiałów bogatokomórkowych, dopuszcza się skrojenie kilku preparatów o grubości 8-10 μm);
3. i 4. preparat o grubości 3-5 μm przeznaczone do oceny rearanżacji genu *ALK* (techniką FISH i IHC, jeśli laboratorium używa tej techniki do wstępnej diagnostyki rearanżacji genu *ALK*);
5. preparat o grubości 3 μm przeznaczony do ponownej oceny zawartości komórek nowotworowych [6-8].

D. Rekomendacja: Konieczne jest dokonanie oceny ilości i jakości DNA po jego wyizolowaniu z materiału diagnostycznego [6-8].

E. Rekomendacja: Analiza genetyczna materiału cytologicznego utrwalonego

na szkiełku podstawowym powinna być wykonana w rozmazach wybarwionych hematoksyliną i eozyną (H+E). Nie rekomenduje się wykorzystywania szkiełek z barwień immunohistochemicznych [6-8, 13-14].

Zaleca się, aby identyfikacja komórek nowotworowych i ich lokalizacji w preparacie była dokonywana przez patomorfologa. Postępowanie w laboratorium genetycznym powinno obejmować inkubację preparatu w roztworze ksylenu przez co najmniej 4-6 godzin, optymalnie 12 godzin, usunięcie szkiełka nakrywkowego oraz izolację DNA z komórek usuniętych mechanicznie ze szkiełka podstawowego wyłącznie z miejsc uprzednio oznaczonych przez patomorfologa [6-8, 13-14].

F. Rekomendacja: Laboratorium genetyczne ma obowiązek ustalenia w drodze wewnętrznej kontroli jakości minimalnego odsetka komórek nowotworowych w preparacie, który zapewnia wiarygodną ocenę mutacji genu *EGFR* [6-8, 12].

Dopuszcza się wykonanie mikrodyssekcji komórek nowotworowych z badanego materiału celem zwiększenia ich odsetka [6-8].

G. Rekomendacja: Do izolacji DNA należy wykorzystywać zestawy odczynników przeznaczone do diagnostyki *in vitro* (oznaczone symbolem CE-IVD) [6-8, 12].

H. Rekomendacja: Laboratorium genetyczne może wykorzystywać różne techniki oznaczania mutacji genu *EGFR*, pod warunkiem że zostały one poddane walidacji i dokładnie opisane zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych [Dz.U. 2011 nr 82 poz 451]). Wskazane jest stosowanie metod przeznaczonych do diagnostyki *in vitro* (oznaczone symbolem CE-IVD) [6-8, 12, 15-17].

Zaleca się korzystanie z technik opartych na reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*), w tym przede wszystkim real-time PCR. Konieczne jest, aby czułość stosowanej metody analizy mutacji genu *EGFR* zapewniała wiarygodną analizę materiału tkankowego zawierającego co najmniej 50% komórek nowotworowych. W takich materiałach dopuszczalna jest analiza genetyczna z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sangera. Wskazane jest jednak, stosowanie bardziej czułych technik molekularnych umożliwiających identyfikację mutacji genu *EGFR* w materiale zawierającym co najmniej 10% komórek nowotworowych [6-8, 15-16].

Zaleca się, aby laboratorium nieposiadające technicznych możliwości analizy genetycznej materiału o niskim odsetku komórek nowotworowych, niezwłocznie przekazało go do ośrodka referencyjnego, informując o tym również zleceńodawcę [6-8].

I. Rekomendacja: Wymagane jest aby laboratorium dysponowało metodyką umożliwiającą identyfikację wszystkich mutacji genu *EGFR*, których częstość występowania wynosi co najmniej 1% (wśród znanych mutacji genu *EGFR*) [6-8, 16]. (Tab. 1)

Tabela 1. Znane mutacje w genie *EGFR* (NM_005228.3), których częstość występowania wynosi co najmniej 1% spośród wszystkich mutacji tego genu [16].

Ekson genu <i>EGFR</i>	Kodon genu <i>EGFR</i>	Mutacja	Substytucje nukleotydowe	Szacowana częstość występowania wśród mutacji <i>EGFR</i>	
18	E709	p.E709K	c.2125G>A	1	
		p.E709A	c.2126A>C		
		p.E709G	c.2126A>G		
		p.E709V	c.2126A>T		
		p.E709D	c.2127A>C, c.2127A>T		
		p.E709Q	c.2125G>C		
G719	G719	p.G719S	c.2155G>A	2-5	
		p.G719A	c.2156G>C		
		p.G719C	c.2155G>T		
		p.G719D	c.2156G>A		
19	K739 I740 P741 V742 A743 I744	Insercje 18-pz		1	
	E746	Delecje (pz)		45	
	L747	9			
	R748	12			
	E749	15			
	A750	18			
	T751	24			
	20	S768 V769 D770 N771 P772 H773 V774	Insercje (pz) 3 9		4-10
		S768	p.S768I	c.2303G>T	1-2
		T790	p.T790M	c.2369C>T	2
21		L858	p.L858R	c.2573T>G	40
			p.L858M	c.2572C>A	
L861		L861	p.L861Q	c.2582T>A	2-5
	p.L861R		c.2582T>G		

pz – pary zasad

J. Rekomendacja: Zaleca się, aby badanie materiału tkankowego w kierunku mutacji T790M genu *EGFR* (związanej z opornością na IKT *EGFR*) była wykonywana za pomocą technik o wysokiej czułości, zapewniających wiarygodną analizę materiału zawierającego co najmniej 5% komórek nowotworowych [6-8].

K. Rekomendacja: Nie zaleca się stosowania reakcji IHC do określenia ekspresji białka *EGFR* oraz badania liczby kopii genu *EGFR* techniką fluorescencyjnej lub chromogenicznej hybrydyzacji *in situ* w celu kwalifikacji do terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR*. Nie zaleca się także oznaczania mutacji w genie *KRAS* w celu kwalifikacji do terapii IKT *EGFR* [2, 6-8].

5. Wymagania dotyczące technik oraz zakresu badania rearanżacji genu *ALK*

A. Rekomendacja: Konieczne jest potwierdzenie obecności rearanżacji genu *ALK* w materiale tkankowym za pomocą techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z wykorzystaniem sond dwukolorowych typu „*break-apart*”. Technika reakcji immunohistochemicznej może być stosowana jako metoda przesiewowa w kwalifikacji materiałów tkankowych do oznaczenia rearanżacji *ALK* techniką FISH pod warunkiem uprzedniej walidacji. Zaleca się wykorzystywanie zestawów posiadających certyfikat do diagnostyki *in vitro* (oznaczone symbolem CE-IVD) [6, 15-19].

B. Rekomendacja: Nie zaleca się stosowania techniki RT-PCR jako metody alternatywnej do metody FISH w ocenie rearanżacji genu *ALK* [6, 18-19].

C. Rekomendacja: Zaleca się, aby wybór reprezentatywnego materiału do oceny rearanżacji genu *ALK* był dokonywany przez patomorfologa zgodnie z zaleceniem zawartym w pkt. 4 Rekomendacja C. Konieczne jest również określenie architektury tkanki nowotworowej lub lokalizacji komórek nowotworowych w materiale cytologicznym jak również jakości tego materiału [6, 18-19].

Materiał do badania rearanżacji genu *ALK* powinien być przechowywany w bloczkach parafinowych (materiał histologiczny lub cytobloki). Brak jest możliwości wiarygodnego oznaczenia rearanżacji genu *ALK* w preparatach cytologicznych barwionych H+E lub w reakcji immunohistochemicznej [6, 18-19].

D. Rekomendacja: Zaleca się, aby badanie rearanżacji genu *ALK* było wykonywane tylko przez personel, który posiada udokumentowane szkolenie z danej dziedziny diagnostycznej. Za nadzór i autoryzację wyników odpowiada diagnosta laboratoryjny posiadający odpowiednią specjalizację (laboratoryjna genetyka medyczna) lub lekarz specjalista z patomorfologii i posiadają udokumentowane co najmniej dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej metodami molekularnymi. Warunkiem koniecznym jest równoczesne stosowanie kontroli pozytywnej i negatywnej.

Zaleca się, aby ocena wizualna preparatów była zawsze dokonywana przez dwóch niezależnych obserwatorów posiadających doświadczenie w interpretacji i odczycie wyników badań FISH oraz IHC [6, 18-19].

Zaleca się, aby w ocenie preparatów uczestniczył patomorfolog posiadający doświadczenie w interpretacji i odczycie wyników barwienia metodą FISH.

E. Rekomendacja: Nie są wymagane badania diagnostyczne w kierunku mutacji genu *ALK* związanych z nabytą opornością na inhibitory kinazy tyrozynowej *ALK* [6, 19].

Sporządzanie sprawozdań z badania genetycznego oznaczania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK*

A. Rekomendacja: Konieczne jest aby sprawozdanie z badania mutacji genu *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* zawierało wynik badania przedstawiony zgodnie z nomenklaturą *Human Genom Variation Society* (HGVS) [20] oraz jego interpretację sformułowaną w sposób zrozumiały dla lekarza onkologa lub pulmonologa oraz patomorfologa.

B. Rekomendacja: Zaleca się, aby sprawozdanie z badania genetycznego mutacji genu *EGFR* zawierało w szczególności: 1) dane umożliwiające niewątpliwą identyfikację pacjenta; 2) dane identyfikujące ośrodek zlecający badanie genetyczne oraz nazwisko lekarza onkologa lub pulmonologa zlecającego badanie; 3) dane identyfikujące pracownię patomorfologii, w której przeprowadzono badanie patomorfologiczne oraz nazwisko wykonującego to badanie lekarza patomorfologa; 4) numer preparatu skierowanego do badania genetycznego wraz z dokładnym rozpoznaniem patomorfologicznym i odsetkiem komórek nowotworowych zawartych w preparacie oraz wynikami badań immunohistochemicznych, jeżeli były przeprowadzane; 5) opis i czułość techniki wykorzystanej do oceny mutacji genu *EGFR*; 6) wykaz badanych mutacji; 7) opisową ocenę jakości wyizolowanego DNA; 8) wynik badania genetycznego wraz z interpretacją kliniczną; 9) datę otrzymania materiału i przeprowadzenia badania; 10) podpis diagnosty laboratoryjnego wykonującego oznaczenie oraz osoby autoryzującej wynik: diagnosty laboratoryjnego ze specjalizacją z laboratoryjnej genetyki medycznej, lekarza patomorfologa lub lekarza ze specjalizacją z genetyki klinicznej. Nie zaleca się, aby sprawozdanie z badania genetycznego zawierało szczegółowe sugestie odnośnie wyboru konkretnego leku ukierunkowanego molekularnie [6-8, 12].

C. Rekomendacje: Sprawozdanie z badania genetycznego rearanżacji genu *ALK* powinno zawierać dane wymienione w punktach 1-4 oraz 6-7 Rekomendacji B w pkt. 6, a także obligatoryjnie opis techniki wykorzystanej do oceny rearanżacji genu *ALK*, informację na temat liczby ocenionych jąder komórkowych (technika FISH) i poziomu ekspresji białka EML4-*ALK* (technika IHC) [6-8].

Piśmiennictwo

1. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 24 lutego 2014r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych (D. U. MZ 2014.42).
2. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of *EGFR* for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009; 28: s14-s23.
3. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M i wsp. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(2): 244-85.
4. Travis WD, Brambilla E, Rielyl GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013; 31(8): 992-1001.
5. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski W. Miejsce patomorfologii w terapii celowanej raka płuca. *Pol J Pathol*. 2010; 1: s74-s79.
6. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB i wsp. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for *EGFR* and *ALK* tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2013; 8(7): 823-59.
7. Shim HS, Chung JH, Kim L i wsp. Guideline recommendations for *EGFR* mutation testing in lung cancer: proposal of the Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group. *Korean J Pathol*. 2013; 47(2): 100-106.
8. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM i wsp. Consensus for *EGFR* mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol*. 2010; 5: 1706-13.
9. Mirsadraee S, Caulo A, Oswal D i wsp. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol*. 2012; 4(4): 128-34.
10. Rami-Porta R, Croweley JJ, Goldstrwa P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 15: 4-9.
11. Ustawa z dnia 27 lipca 2001 r. o Diagnostyce Laboratoryjnej (Dz.U. 2001 nr 100 poz. 1083).
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 roku zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz. U. MZ 09.22.128).
13. Navani N, Brown JM, Nankivell M i wsp. Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for subtyping and genotyping of non-small cell lung cancer: a multicenter study of 774 patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185: 1316-22.
14. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS i wsp. Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accura-

- cy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *J Thorac Oncol.* 2011;6: 451-458.
15. Ellison G, Zhu G, Moulis A i wsp. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol.* 2013; 66: 79-89.
 16. Skroński M, Szpechciński A, Chorostowska-Wynimko J. Współczesne metody wykrywania mutacji genu EGFR jako czynnika predykcyjnego dla terapii ukierunkowanej molekularnie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca – czy istnieje złoty standard diagnostyczny? *Pneumonol Alergol Polska* 2014, *Pneumonol Alergol Pol.* 2014;82(3):311-22.
 17. Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451).
 18. Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Ramlau R i wsp. The analysis of ALK gene rearrangement by fluorescence in situ hybridisation in non-small cell lung cancer patients. *Contemp Oncol.* 2013; 17: 484-92.
 19. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. IASCL atlas of ALK testing in lung cancer. International Association for the Study of Lung Cancer, Aurora, Colorado, USA. 2013.
 20. Human Genetic Variation Society. <http://www.hgvs.org>